

Studier av peptiders elektrokinetiske migrasjon over en kunstig væskemembran

Jeanette Stigsson



Faggruppen for Legemiddelanalyse

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi,

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskaplige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2011

Studier av peptiders elektrokinetiske migrasjon over en kunstig væskemembran

Jeanette Stigsson

Masteroppgaven ble gjennomført ved faggruppen for Legemiddelanalyse, avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt ved Universitetet i Oslo, perioden mars 2010 til mai 2011.

Veiledere: Professor Stig Pedersen-Bjergaard
 Marte Balchen, PhD
 Astrid Gjelstad, PhD

Innhold

1. SAMMENDRAG	6
2. FORKORTELSER.....	7
3. INNLEDNING	9
4. TEORI.....	12
4.1 ELEKTROMEMBRANEKSTRAKSJON	12
4.2 MASSETRANSPORT.....	13
4.2.1 Membran.....	14
4.2.2 Ionebalanse og pH.....	15
4.2.3 Spenning og elektrisitet	16
4.3 KAPILLÆRELEKTROFORESE	17
5. EKSPERIMENTELT.....	19
5.1 MODELLSUBSTANSER	19
5.2 UTSTYR OG FREMGANGSMÅTE FOR EME.....	20
5.3 BETINGELSER FOR CE.....	21
5.3.1 Tillaging av kondisjoneringsreagens og separasjonsbuffer	22
5.4 LØSNINGER OG BUFFERE	22
5.4.1 Stamløsninger.....	22
5.4.2 Standardløsninger	22
5.4.3 Prøveløsninger	22
5.4.4 Prøveløsninger til stabilitetsforsøk.....	23
5.4.5 Prøveløsninger med transportmolekyler	24
5.4.6 Akseptorløsninger.....	24
5.4.7 Organiske faser	24
5.4.8 Strømmålinger	25

5.4.9	<i>Kjemikalier</i>	25
5.5	BEREGNING AV UTBYTTE	28
6.	RESULTATER OG DISKUSJON	29
6.1	INNLEDENDE FORSØK	29
6.1.1	<i>Peptidenes migrasjonsrekkefølge i CE</i>	29
6.1.2	<i>Løsningens stabilitet</i>	31
6.2	SELEKTIVE EKSTRAKSJONSUTBYTTER BASERT PÅ PEPTIDENES KJEMISKE EGENSKAPER	33
6.2.1	<i>Valg av organisk fase</i>	33
6.2.2	<i>Ulike pH-betingelser</i>	34
6.3	EFFEKT AV ULIKE TRANSPORTMOLEKYLER	39
6.3.1	<i>Screeninganalyse</i>	39
6.3.2	<i>Sammenligning av transportmolekyler</i>	42
6.3.3	<i>Tiltak for å øke ekstraksjonsutbyttene</i>	43
6.4	KARBOKSYLSYRER SOM TRANSPORTMOLEKYLER	47
6.5	EFFEKT AV TRANSPORTMOLEKYLER I PRØVELØSNINGEN	48
7.	KONKLUSJON	50
8.	REFERANSELISTE	51
9.	VEDLEGG	53
9.1	VEDLEGG I - TRANSPORTMOLEKYLER	53
9.2	VEDLEGG II - PEPTIDSTRUKTURER	59

Forord

Jeg ønsker herved å få takke professor Stig Pedersen-Bjergaard, doktor Marte Balchen og doktor Astrid Gjelstad for et år med trygg veiledning, kreative påfunn og lærerike samtaler. Hos dere har dørene bokstavlig talt alltid stått åpne, og selv de enkleste spørsmål har blitt besvart med tålmodighet. Tusen takk for dette året!

Jeg vil også rette en stor takk til øvrige ansatte på avdelingen for legemiddelanalyse for en inkluderende holdning fra første stund. Spesielt vil jeg takke Knut Fredrik for faglige innspill underveis.

Til mine medstudenter Ragnhild, Karoline og Hamid: Dere er tre flotte mennesker, takk for alle gode samtaler!

OSLO, Mai 2011

Jeanette Stigsson

1. Sammendrag

Det har i dette arbeidet blitt undersøkt hvordan ekstraksjonskjemiske parametre kan påvirke utbyttet av ni ulike peptider ved bruk av elektromembranekstraksjon (EME) som prøveopparbeidelsesmetode. Peptidene ble ekstrahert fra en vandig donorløsning (500 µl) over en organisk væskefase immobilisert i veggen på en porøs hulfiber, og videre inn i en vandig akseptorfase (25 µl). I donor- og akseptorløsningen var det plassert en anode respektive katode. Det ble pålagt en spenning på 10 volt og ekstraksjonen fikk pågå i fem minutter mens ekstraksjonsoppsettet ble utsatt for en agitasjonshastighet på 900 rpm.

Det ble undersøkt om det var mulig å foreta selektiv ekstraksjon av peptider basert på pH-enderinger i donor- og akseptorfase. I hovedsak ble 1-oktanol, diisobutylketon (IBK) og di(2-etylheksyl)fosfat (DEHP) i forholdet 55:35:10 (w/w) brukt som organisk væskefase i disse forsøkene. Variasjoner i pH ga imidlertid ingen seleksjon, samtlige peptider ble detektert i akseptorløsningen ved de ulike forsøkene. De laveste utbyttene, 3-18 %, ble registrert ved pH 12.0 i både donor- og akseptorløsning. De høyeste utbyttene, 11-62 %, ble registrert ved pH 3.0 i donorløsningen og pH 1.3 i akseptorløsningen.

I et forsøk på å oppnå økte ekstraksjonsutbytter ble det utført ekstraksjoner med totalt 20 ulike transportmolekyler (*carrier molecules*) som hver og ett ble tilsatt den organiske fasen 1-oktanol:IBK. Transportmolekylene tridecylfosfat (TDP), dibutylfosfat og DEHP ga utbytter på henholdsvis 13-55 %, 2-30 % og 10-58 %. I et forsøk på å øke utbyttene ytterligere ble det tilsatt 5 mM tri-*n*-oktylfosfinoksid (TOPO) til 1-oktanol:IBK:DEHP og 1-oktanol:IBK:TDP. TOPO viste imidlertid ingen tegn til å øke ekstraksjonsutbyttene. Det ble også testet om karboksylsyrer kunne egne seg som transportmolekyler. I disse forsøkene ble kun endomorfin og enkefalin, som forøvrig er de to minste og mest hydrofobe av de ni peptidene, ekstrahert over den kunstige væskemembranen. Disse to peptidene lot seg imidlertid ekstrahere selv uten transportmolekyler i den organiske fasen. I et nytt forsøk på å øke peptidenes fordeling inn i den organiske fasen, ble det tilsatt transportmolekyler direkte i donorfasen. Som transportmolekyler i disse forsøkene ble det brukt sulfonsyrer. Også her var peptidene endomorfin og enkefalin de eneste som ble ekstrahert over den organiske væskemembranen.

Mer forskning er nødvendig for å forstå eksakt hvordan peptider oppfører seg i det elektriske feltet samt hvordan de fordeler seg mellom de ulike fasene i EME.

2. Forkortelser

HCl	Saltsyre
NaCl	Natriumklorid
NaOH	Natriumhydroksid
NH ₃	Ammoniakk
H ₃ PO ₄	Orto-fosforsyre
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenfosfat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenfosfat
HCOOH	Maursyre
NPOE	2-Nitrofenyloktyleter
DEHP	Di(2-etylheksyl)fosfat
TOPO	Tri- <i>n</i> -oktylfosfinoksid
TDP	Tridecylfosfat
IBK	Diisobutylketon
15-crown-5	15-crown-5-ether
ATIII	Angiotensin 3
BK	Bradykinin
ATI	Angiotensin 1
ATII	Angiotensin 2
VP	Vasopressin
NT	Neurotensin
ATII2	Angiotensin-2-antipeptid
Endo	Endomorfin
Enke	Enkefalin
CE	Kapillærelektroforese
EME	Elektromembranekstraksjon
LLE	Liquid Liquid Extraction (Væske-væskeekstraksjon)
LPME	Liquid Phase Micro Extraction (Væskefasemikroekstraksjon)
RSD	Relativt standardavvik
SPE	Solid Phase Extraction (Fast-faseekstraksjon)
UV	Ultrafiolett
rpm	Revolutions per minute (Rotasjoner per minutt)
i.d.	Indre diameter

Forkortelser

ml	Milliliter
μl	Mikroliter
nl	Nanoliter
g	Gram
mg	Milligram
μg	Mikrogram
Mw	Molekylvekt (g/mol)
cm	Centimeter
mm	Millimeter
μm	Mikrometer
nm	Nanometer
M	Molar (mol/liter)
mM	Millimolar
V	Volt
kV	Kilovolt
mA	Milliampere
μA	Mikroampere
mAU	Milli Absorbance Unit
mbar	Millibar
pI	Isoelektrisk punkt

3. Innledning

Biologiske prøver har ofte en kompleks stoffsammensetning i hvilken analytter kan foreligge i svært lave konsentrasjoner. Dette gjør analyse av eksogene så vel som endogene substanser utfordrende og det stilles høye krav til analyseinstrumentets yteevne. Selv med dagens avanserte utstyr kan det være vanskelig å separere alle stoffer i en biologisk matriks og ved direkte injeksjon kan dessuten stoffer fra prøven være direkte ødeleggende for analyseinstrumentet. Forut for selve analysen er det derfor ofte nødvendig å foreta en prøveopparbeidelse som fjerner forstyrrende forurensninger og som kan oppkonsentrere analytten der dette er påkrevet.

Av de ulike metodene for prøveopparbeidelse er *væske-væskeekstraksjon* (LLE) og *fast-faseekstraksjon* (SPE) to av de mest brukte. I LLE fordeles analytten mellom to ikke-blandbare væsker, mens i SPE fordeles analytten mellom en væske og et fast stoff. Selv om LLE er en veletablert metode er det en arbeidsom og tidkrevende teknikk med et høyt forbruk av giftige løsemidler. SPE er imidlertid noe raskere og mengden organisk løsemiddel er betydelig redusert. Imidlertid kan forbruket av utstyr gjøre metoden relativt kostbar sammenlignet med LLE. Forbedringspotensialet hos så vel LLE som SPE har motivert til utvikling av miniaturiserte teknikker for prøveopparbeidelse [1, 2].

I begynnelsen av 1990-tallet ble det utviklet en miniaturisert teknikk for SPE. Den nye metoden fikk navnet *fast-fasemikroekstraksjon* (SPME) og baserte seg på en likevektsfordeling av analytten mellom prøveløsningen og den faste fasen. I et SPME-system er den faste fasen en polymerimpregnert silikafiber som er konstruert slik at den minner om spissen på en kanyle. Fiberen dyppes i, eller holdes over prøveløsningen tilstrekkelig lenge til at analytten kan fordele seg mellom den vandige prøveløsningen og fiberens organiske polymerhinne. Med riktig utstyr kan deretter fiberen introduseres direkte på analyseinstrumentet med påfølgende desorpsjon av analytten [3, 4].

Parallelt med utviklingen av SPME ble det også arbeidet med å finne en metode for LLE der løsemiddelforbruket skulle være lavere, og ekstraksjonstiden kortere, enn ved tradisjonell LLE. I 1996 ble det introdusert en metode for væskefasemikroekstraksjon (LPME) som fikk navnet *single drop liquid phase microextraction* (SD-LPME). Én enkelt dråpe løsemiddel hengende fra spissen på en kanyle utgjør den organiske fasen i dette systemet. Dråpen blir plassert i prøveløsningen slik at analytten, basert på dens fordelingskoeffisient, kan

ekstraheres over i den organiske fasen. Den organiske fasen kan deretter aspireres og injiseres direkte i passende analyseapparat [5, 6]. Den lille mengden organisk fase som blir brukt, legger forholdene til rette for et mindre toksisk arbeidsmiljø og en vesentlig oppkonsentrering av analyttene i prøven. For å få ekstraksjonen til å gå raskere ble det forsøkt med agitasjon, men da oppstod problemer med stabiliteten i form av at dråpen løste ut i prøven under ekstraksjonen [7].

I 1999 ble det presentert en ny teknikk for LPME basert på hulfiber innsatt med organisk løsemiddel. Med denne teknikken blir analytten ekstrahert fra prøven, gjennom veggen på hulfiberen med den organiske fasen, og videre inn i en akseptorløsning i fiberens hulrom (lumen) [8]. Akseptorløsningen kan deretter injiseres direkte i passende analyseinstrument. Transporten av analytt over hulfiberens vegg er basert på passiv diffusjon, samt pH-gradient i tilfeller hvor dette er mulig. Selv om drivkraften i dette systemet ofte gir tilfredsstillende utbytter er prosessen tidkrevende med typiske ekstraksjonstider på 15-60 minutter [9].

Videre arbeid med å redusere ekstraksjonstiden for LPME resulterte i en ny teknikk der elektroder ble festet på hver side av hulfiberens vegg – en i prøveløsningen og en i akseptorløsningen. Ved å legge på et spenningsfelt over hulfiberen kunne ladede analytter vandre fra donor- til akseptorløsningen. Den nye, raskere teknikken ble introdusert for første gang i 2006 og fikk navnet elektromembranisolasjon (EMI), senere elektromembranekstraksjon (EME). Med EME kunne ekstraksjonstidene reduseres helt ned i fem minutter. Rask ekstraksjonstid, rene ekstrakter, lavt forbruk av organiske løsemidler (~ 15 µl), små prøvevolumer (~300 µl), mulighet for direkteinjeksjon av akseptorfase på analyseinstrumentet samt mulighet for automatisering er egenskaper som gjør at denne teknikken har et veldig lovende potensial [10]. Variasjoner i spenning, væskevolumer, tid, pH og organisk fase har blitt testet ut for ulike legemidler og peptider. Variasjonene er utallige og arbeidet med å finne de best egnede kombinasjonene er tidkrevende. Generelt har peptider vist seg å være vanskeligere å ekstrahere enn legemidler. En årsak til dette kan være at peptider er større og mer kompliserte molekyler som ikke oppfører seg like forutsigbart som mange av legemiddelsubstansene [9, 11-19].

Peptider tilhører en gruppe forbindelser med stor funksjonsdiversitet. De kan fungere som biomarkører, hormoner, antioksidanter, nevrotransmittere eller legemidler, for å nevne noen eksempler. Deres store virkeområde har økt interessen og behovet for peptidanalyse så vel i forskningssammenheng som på rutinelaboratoriet. Hvis EME som

prøveopparbeidelsesteknikk kan gjøre peptidanalyse raskere og enklere, vil trolig mange aktører rette søkelyset mot nettopp EME.

Tidligere arbeid har generert mye fundamental vitenskaplig informasjon om EME av peptider; informasjon som har ligget til grunn for denne masteroppgaven. Målet med denne oppgaven var å undersøke hvordan ulike ekstraksjonskjemiske parametre kunne

a) gi en mer selektiv EME av peptider eller

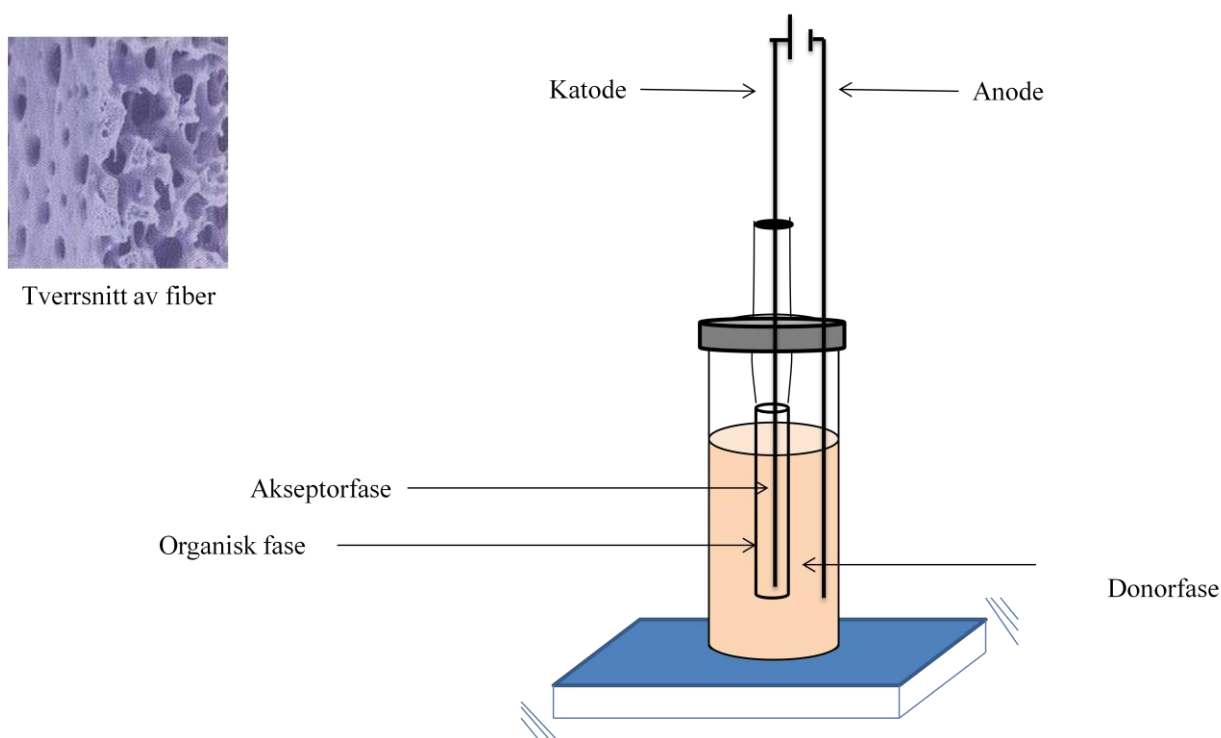
b) gi høyere ekstraksjonsutbytter.

Dette ble undersøkt ved å eksperimentere med ulike organiske faser, pH-variasjoner i donor- og akseptorløsningen samt ulike transportmolekyler (*carrier molecules*) i den organiske fasen og i donorfasen.

4. Teori

4.1 Elektromembranekstraksjon

EME er en miniaturisert prøveoppbeirelsesteknikk der ladede analytter ekstraheres ut av en prøveløsning, via en kunstig væskemembran, og videre inn i en akseptorfase ved hjelp av et påført elektrisk felt. Denne teknikken har flere fordeler som for eksempel hurtig ekstraksjonstid, oppkonsentrering og isolering av analytt, små prøveløsningsvolumer samt lavt forbruk av toksiske løsemidler.



Figur 4.1: Ekstraksjonsoppsett for EME

Figur 4.1 viser ekstraksjonsoppsettet for EME der en vial er fylt med en vandig donorløsning som er pH-regulert på en slik måte at analyttene lades. I donorløsningen plasseres en polypropylenfiber som både bærer den organiske fasen og akseptorfasen. Den organiske fasen immobiliseres i porene i fiberens vegg, mens akseptorfasen fylles i fiberens lumen. En vandig akseptorfase vil gi et trefasesystem tilsvarende væske-væskeekstraksjon med tilbakeekstraksjon. Hulfiberen føres ned i væsken via et hull i lokket på vialen. Det plasseres en platinaelektrode i donorfasen og en i akseptorfasen; disse kobles deretter til en spenningskilde slik at ladede analytter kan transporteres over den kunstige væskemembranen og inn i akseptorfasen. Oppsettet plasseres på et ristebrett som sørger for agitasjon i systemet under hele ekstraksjonen. Agitasjonen gjør at væsken sirkulerer og dette øker sannsynligheten for at alle analyttmolekylene får direktekontakt med fiberveggen i løpet av ekstraksjonen [10].

4.2 Massetransport

Massetransporten, J , defineres som mengden molekyler som passerer en bestemt arealenhet, under en bestemt tidsenhet. Det er utviklet en matematisk modell som beskriver massetransporten av ladede analytter i et elektrisk felt gjennom en kunstig væskemembran. Formel 4.2-1 beskriver massetransporten for en ladet analytt I EME [16].

$$J_i = -\frac{D_i}{h} \left(1 + \frac{v}{\ln \chi} \right) \left(\frac{\chi - 1}{\chi - \exp(-v)} \right) (C_i - C_{i0} \exp(-v))$$

Formel 4.2-1: Modifikasjon av Nernst-Plank's ligning

Formel 4.2-1 viser at massetransporten for et bestemt ion er avhengig av ionets diffusjonskoeffisient (D_i), membranens tykkelse (h), den totale ionebalansen mellom donor- og akseptorløsningen (χ), ionets konsentrasjon i overgangen mellom den kunstige væskemembranen og prøveløsningen (C_i), ionets konsentrasjon i overgangen mellom den kunstige væskemembranen og akseptorløsningen (C_{i0}) og en dimensjonsløs drivkraft (v) som beskrives i formel 4.2-2 [16].

$$v = \frac{z_i e \Delta \Phi}{kT}$$

Formel 4.2-2: Drivkraft

Drivkraften, v , bestemmes av ionets ladning (z_i), elementær ladningen (e) og spenningsforskjellen over væskemembranen ($\Delta \Phi$); Boltzmann's konstant (k) og den absolutte temperaturen (T).

Formel 4.2-1 og 4.2-2 viser at valg av membran, spenning, ionebalanse og temperatur er kritiske parametre som avgjør analyttens massetransport over den kunstige væskemembranen. I et ekstraksjonsoppsett der spenning, membrantykkelse og temperatur holdes konstant kan massetransporten påvirkes av endringer i ionebalansen (χ) og endringer i membransammensetningen [16].

4.2.1 Membran

Membranenheten i EME består av en organisk væske som er immobilisert i porene på en sylinderformet hulfiber av polypropylen. Egenskapene til den organiske væsken vil avgjøre analyttens diffusjon (D_i) og fordeling ($C_i - C_{i0}$). Følgelig vil endringer i organisk fase påvirke analyttens massetransport. Ved å eksperimentere med ulike organiske faser kan ekstraksjonen av en bestemt analytt, eller en gruppe analytter, optimaliseres. I tidligere studier har ofte nitroaromatiske løsningsmidler, som for eksempel 2-nitrofenyloktyleter (NPOE), blitt brukt for å ekstrahere basiske legemidler [9, 20, 21]. Sure legemidler derimot, ekstraheres med høyere utbytter ved bruk av langkjedede alkoholer som organisk fase [11, 15, 22]. Mer polare analytter har imidlertid lav fordeling inn i organiske væsker, noe som ofte leder til lave ekstraksjonsutbytter. For å øke utbyttene kan det tilsettes et transportmolekyl som kan danne et nøytralt kompleks med analytten, og på denne måten være en transportør for analytten gjennom den organiske fasen. Et eksempel på et slikt stoff er ionparreagenset di(2-etylheksyl)fosfat (DEHP). Tidligere arbeider har vist at DEHP øker ekstraksjonsutbyttet for ladede peptider i det sure pH-området [15]. I grenseflaten mellom donorfase og organisk fase vil DEHP orientere seg med den hydrofobe delen av molekylet inn i den organiske fasen, og den hydrofile fosfatgruppen vil orientere seg i retning vannfasen. Hvis pH i donorfasen er over pKa-verdien for DEHP (pKa = 1.5 [23]), vil fosfatgruppen deprotoneres og DEHP kan danne et nøytralt og hydrofobt kompleks med de

positive ladningene på peptidene. Dermed øker peptidenes transport gjennom den organiske fasen. I overgangen mellom organisk fase og akseptorfase brytes bindingene mellom DEHP og peptidene ved at protoner erstatter peptidenes plass. Lav pH i akseptorløsningen vil derfor fremme frigjøringen av peptider fra DEHP [15].

4.2.2 Ionebalanse og pH

Som vist i formel 4.2-1 er massetransporten avhengig av ionebalansen χ . Ionebalansen beskriver forholdet mellom den totale ionekonsentrasjonen i donorløsningen og akseptorløsningen. En nedgang i ionebalanse, dvs. en høy ionekonsentrasjon i akseptorløsningen i forhold til donorløsningen, forventes å gi en oppgang i massetransport [16].

$$\chi = \frac{\sum_i C_{ih} + \sum_{\kappa} C_{\kappa h}^*}{\sum_i C_{i0} + \sum_{\kappa} C_{\kappa 0}^*}$$

Formel 4.2-3: Definisjon av ionebalanse

Definisjonen av ionebalansen er beskrevet i formel 4.2-3 der C_{ih} og $C_{\kappa h}^*$ er konsentrasjonen av kationer respektive anioner i donorløsningen, mens C_{i0} og $C_{\kappa 0}^*$ er konsentrasjonen av kationer respektive anioner i akseptorløsningen [16]. Det er utført en rekke EME-eksperimenter hvor konsentrasjonen av saltsyre (HCl) i donorfasen har variert fra 0.1 til 10 mM, med konstant HCl-konsentrasjon (10 mM) i akseptorfasen. Forsøkene viste at massetransporten var størst ved lavest ionebalanse, dvs. i de ekstraksjonene hvor konsentrasjonen av HCl i donorfasen var 0.1 mM [16].

Konsentrasjonen av HCl bestemmer ikke bare ionebalansen men også pH-verdien i donor- og akseptorfasen. pH-verdien er avgjørende for peptidenes ladning som driver peptidenes migrasjon i det elektriske feltet. Peptider er zwitterioner, noe som innebærer at de kan ha både positiv og negativ ladning. Ved lav pH vil peptidenes negative grupper være undertrykket mens de positive gruppene vil være tent. Ved å plassere den positive elektroden (anoden) i donorløsningen, vil de positivt ladede peptidene støtes mot den negative elektroden (katoden) i akseptorløsningen [15]. Hvert enkelt peptid har en såkalt pI-verdi ved hvilken nettoladning er null. Hvis ekstraksjonen foregår ved peptidenes pI-verdi vil de teoretisk sett ikke ekstraheres i et system der ekstraksjonen drives av en pålagt spenning.

Ideelt sett bør derfor donorløsningens pH ligge to pH-enheter under peptidenes pI-verdi. Dette vil sikre positiv nettoladning med påfølgende migrasjon fra anoden til katoden.

4.2.3 Spenning og elektrisitet

I den matematiske beskrivelsen av massetransport er spenning en viktig parameter som bestemmer drivkraften i systemet. Med utgangspunkt i formel 4.2-1 og 4.2-2, forventes det at massetransporten øker med økende spenning. Denne teorien er støttet opp av eksperimenter som viser at høy spenning gir høye ekstraksjonsutbytter [16]. Spenningen i systemet vil imidlertid ha innvirkning på strømmen slik som beskrevet i Ohm's lov, formel 4.2-4.

$$U = RI$$

Formel 4.2-4: U =spenning, R =motstand, I =strøm

Hvorvidt strømmen i systemet vil være høy eller lav bestemmes ikke bare av den pålagte spenningen, men også av motstanden, R, i kretsen som vist i formel 4.2-4. I EME er det fremfor alt den kunstige væskemembranen som utgjør motstanden og valg av organisk fase er derfor kritisk for strømstyrken [14, 15]. Med økt strøm i systemet vil elektrolyseaktiviteten ved elektrodene eskalere:

Katode (akseptorløsning): $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$

Anode (donorløsning): $\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}^+ + \frac{1}{2}\text{O}_2 + 2\text{e}^-$

Det er tidligere observert at strømverdier over 0.45 mA gir overdreven elektrolyseaktivitet [14]. Høy elektrolyseaktivitet ved katoden kan øke pH-verdien i akseptorløsningen. I donorløsningen vil det derimot genereres protoner og dette kan nedsette pH-verdien. Tilstrekkelig store endringer i pH vil ha innvirkning på peptidenes ladninger, med en påfølgende innvirkning på den elektrokinetiske migrasjonen [15]. I tillegg vil høy elektrolyseaktivitet gi bobleformasjon på elektrodene. Bobleformasjon endrer elektrodens effektive overflateareal, og dette kan gi fluktuasjoner i strømstyrken [14]. Høy strøm i systemet vil også kunne generere varme, med påfølgende fordampning av akseptorfase [17].

4.3 Kapillærelektroforese

Kapillærelektroforese er en relativt enkel analysemetode der analyttene separeres basert på ladning og størrelse. Kapillæret, der separasjonen foregår, er i størrelsesorden 30-70 cm langt med en indre diameter på 50-75 μm . Det injiseres en liten mengde (nl) prøveløsning i kapillærets innløp, deretter plasseres kapillærendene i hver sin buffervial. Bufferen sikrer konstant pH og dermed ladning av analyttene. Kapillæret pålegges en spenning slik at det dannes et elektrisk felt som ladede analytter kan migrere i; dette er illustrert i figur 4.3. I et elektrisk felt vil ioner, avhengig av størrelse og ladning, migrere med ulik hastighet [24]. Ionets hastighet defineres i formel 4.3-1 [25].

$$v = \mu_e E$$

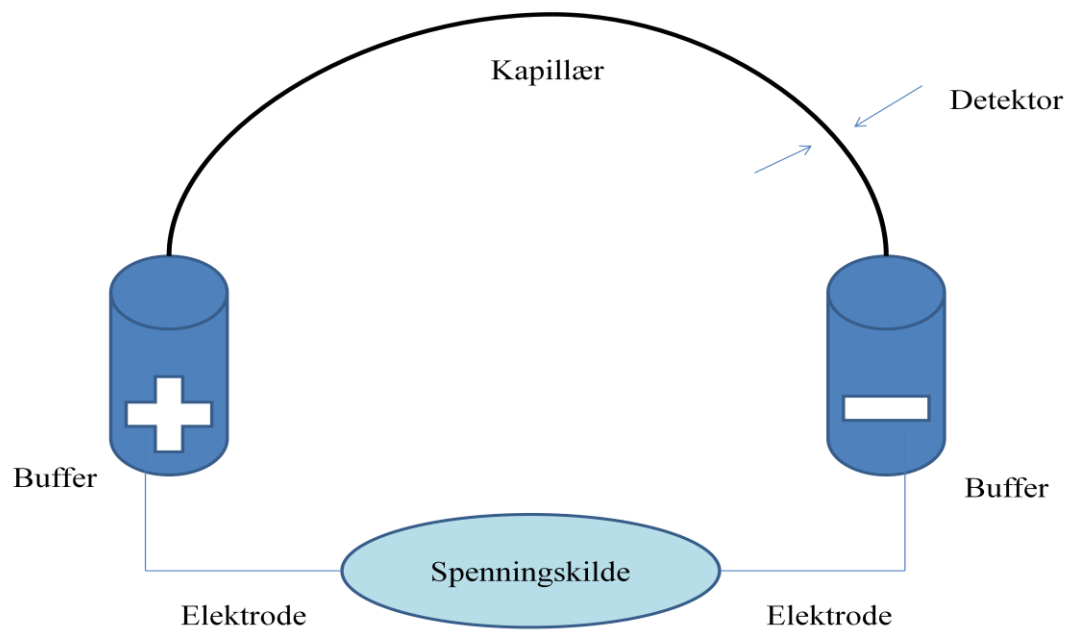
Formel 4.3-1: Ionets hastighet

der μ_e er elektroforetisk mobilitet og E er påført elektrisk felt. Den elektroforetiske mobiliteten defineres i formel 4.3-2 [25].

$$\mu = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

Formel 4.3-2: Elektroforetisk mobilitet

der q er ionets ladning, η er løsningens viskositet og r er ionets radius. Formel 4.3-2 viser at små ioner med flere ladninger har høy mobilitet i kapillærelektroforese mens store ioner med få ladninger vil vandre med lavest hastighet i det elektriske feltet [25]. På basis av disse egenskapene vil stoffene i prøveløsningen separeres og ankomme kapillærets utløp til ulik tid. I nærheten av utløpet sitter det en detektor som registrerer de ulike stoffene. Som regel benyttes en UV-detektor og detektorsignalet plottes som funksjon av tid. Dette plottet kalles et *elektroferogram*. I et elektroferogram vises én topp for hver av stoffene i prøven. Arealet under toppen og migrasjonstid kan benyttes i kvantitativ respektive kvalitativ analyse av stoffer [24].



Figur 4.3: Prinsippskisse for CE.

Analyttene migrerer i det elektriske feltet fra buffervialen med positivt potensial til buffervialen med negativt potensial. I enden av kapillæret er en liten bit av det yttre polyimidlaget fjernet slik at deteksjon kan finne sted.

5. Eksperimentelt

5.1 Modellsustanser

Totalt ni peptider med kjedelengde fra fire til tretten aminosyrer, ble benyttet ved de ulike forsøkene. Peptidenes aminosyresekvens, pI-verdi, hydrofilisitet, molekylvekt, kvalitet og produsent er beskrevet i tabell 5.1.

Tabell 5.1: Oversikt over peptidenes aminosyresekvens, pI-verdi, hydrofilisitet, molekylvekt, kvalitet og produsent.

Peptid	Aminosyre-sekvens ¹	pI ¹	Hydro-filisitet ^{1,2}	Mw	Kvalitet	Produsent
Angiotensin 3 (ATIII)	R VYIHPF	9.8	-0.8	931.1	Renstoff	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Bradykinin acetatsalt (BK)	R PPGFSPFR	12.4	0.1	1060.2	Renstoff	Bachem (Bubendorf, Sveits)
Angiotensin 1 (ATI)	D R VYIHPFHL	7.9	-0.5	1296.5	Renstoff	Bachem (Bubendorf, Sveits)
Angiotensin 2 acetatsalt (ATII)	D R VYIHPF	7.8	-0.3	1046.2	Renstoff	Bachem (Bubendorf, Sveits)
(Arg ⁸) Vasopressin trifluoroacetatsalt (VP)	CYFQNCP R G	9.1	-0.4	1086.3	Renstoff	Bachem (Bubendorf, Sveits)
Neurotensin (NT)	ELYEN K P R RPYIL	9.5	0.4	1673.0	Renstoff	Bachem (Bubendorf, Sveits)
Angiotensin-2-antipeptid (ATII2)	EGVYVHPV	5.1	-0.5	899.0	Renstoff	Bachem (Bubendorf, Sveits)
Endomorfine-1 (endo)	YPWF	9.9	-2	610.7	Renstoff	Bachem (Bubendorf, Sveits)
(5-leucin) Enkefalin (enke)	YGGFL	5.9	-1.3	555.6	Renstoff	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)

1) Kilde: [26]

2) Lavest tallverdi gir lavest hydrofilisitet.

Aminosyrene K (Lysin) og R (Arginin) har pKa-verdier på henholdsvis 10.5 og 12.5s [27].

5.2 Utstyr og fremgangsmåte for EME

Utstyr:

Figur 4.1 viser oppsettet for EME. Spenningskilden som ble brukt var av typen ES 0300-0.45 fra Delta Power Supplies (Delta Electronika, Zierikzee, Nederland), hvor spenningen kunne innstilles fra 0 til 300 volt, og strømmen varieres i området 0-450 mA. Spenningskilden ble koblet til platinaelektroder med en diameter på 0.5 mm (K. Rasmussen, Hamar, Norge). Donorfasen ble fylt i en Brand Snap-Cap beholder av polyetylen (Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland), med et volum på 0.8 ml, indre diameter på 6 mm og høyde på 31 mm. Den porøse hulfiberen som rommet både organisk fase og akseptorfase, var av typen PP (polypropylen) Q3/2 (Membrana, Wuppertal, Tyskland) med en indre diameter på 1.2 mm, veggtykkelse på 200 μm og porestørrelse på 0.2 μm . Til å stabilisere hulfiberen ble det brukt en pipettespiss av polypropylen, Finntip 200 Ext (Thermo Scientific, Vantaa, Finland). Agitasjonen ble utført av et Vibramax 100 ristebrett (Heidolph Instruments, Kelheim, Tyskland).

Fremgangsmåte:

En Brand Snap-Cap beholder ble fylt med 500 μl prøveløsning som utgjorde donorfasen. Den sylinderformede hulfiberen ble klippet opp i lengder på 2.4 cm, som deretter ble mekanisk lukket i den ene enden. Den andre enden ble smeltet fast rundt pipettespissen som var klippet til en lengde på 2.1 cm. Deretter ble den kunstige væskemembranen dannet ved at hulfiberen ble dyppet i det valgte organiske løsningsmiddelet i fem sekunder. Overskuddsvæske ble lett tørket av med en papirserviett. 25 μl akseptorløsning ble trukket opp med hjelp av en mikrosprøyte og overført til hulfiberens lumen. Fiberen, med både den kunstige væskemembranen og akseptorfasen, ble så plassert i donorløsningen via et hull i lokket på Brand Snap-Cap beholderen. Platinaelektrodene ble ført ned i akseptorløsningen via pipettespissen, og ned i donorløsningen via et lite hull i lokket på beholderen. Ekstraksjonsenheten ble deretter plassert på ristebrettet, og spenningskilden ble koblet til med negativt potensial i akseptorfasen og positivt potensial i donorfasen. Ekstraksjonen fikk pågå i fem minutter med en spenning på 10 volt og en agitasjon på 900 rpm. Etter endt ekstraksjon ble 20 μl akseptorløsning trukket ut med hjelp av en finnpipette og overført til en autosamplervial (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) med tilhørende lokk (Agilent Technologies, Boeblingen, Tyskland) for videre analyse i CE-apparatet. I flere av forsøkene ble også donorløsningen analysert.

Valg av utstyr, væskevolumer, temperatur, spenning, ekstraksjonstid og agitasjonshastighet ble gjort på grunnlag av tidligere EME-studier av peptider [14, 15].

5.3 Betingelser for CE

Samtlige analyser for innhold av peptider ble utført med hjelp av kapillærelektroforese. Det ble benyttet et Agilent kapillærelektroforesesystem med UV-deteksjon (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Selve kapillæret var kledd med polyimid på utsiden og fused-silika på innsiden. Kapillæret hadde en effektiv lengde på ca 50 cm og en indre diameter på 75 µm (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA). Tabell 5.3 viser under hvilke betingelser peptidanalysene foregikk.

Tabell 5.3: Betingelser ved kapillærelektroforese

Parameter	Verdi
Spenning	20.00 kV / 30.00 kV
Strøm	30-100 mA
Deteksjonsbølgelengde	200 nm
Trykk ved injeksjon	50.0 mbar
Injeksjonstid	4.00 sekunder
Separasjonsbuffer	Fosfatbuffer pH 2.75
Kassettemperatur	25 °C

Fosfatbufferen med pH 2.75 sikret positiv ladning av peptidene under elektroforesen. Forut for hver analyseserie ble kapillæret kondisjonert med 0.1 M natriumhydroksid (NaOH) i 15 minutter, så ble det spylt med destillert vann i fem minutter og deretter separasjonsbuffer i 15 minutter. Mellom ca hver 8. analyse ble det utført en såkalt *replenish*. Under replenishprogrammet ble buffervialenes innhold byttet med nyfiltrert buffer fra bufferbeholderen i apparatet; avfallsvialen ble tømt og kapillæret ble spylt med separasjonsbuffer i to minutter. Kapillæret ble også spylt med separasjonsbuffer (to minutter)

mellom hver enkelt analyse. Etter at samtlige analyser var gjennomført ble kapillæret spylt med destillert vann i tre minutter, og luft i fem minutter.

5.3.1 Tillaging av kondisjoneringsreagens og separasjonsbuffer

0,1 M NaOH for kondisjonering

Tillaging av 0,1 M: 1 g NaOH ble veid ut og fortynnet med destillert vann til 250 ml.

Fosfatbuffer ved bruk av fused-silika kapillær, 25 mM, pH 2.75

3.45 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ble veid ut og løst i destillert vann til et totalvolum på 1 liter, og en konsentrasjon på 25 mM. 0.84 ml H_3PO_4 , 85 %, ble målt opp og fortynnet med destillert vann til 500 ml. NaH_2PO_4 -løsningen ble deretter titrert med 25 mM H_3PO_4 til pH 2.75. Bufferen ble så filtrert med et 0.45 μm Ministart RC 25 single use syringe filter (VivaScience AG, Hannover, Tyskland).

5.4 Løsninger og buffere

5.4.1 Stamløsninger

Tørrstoff av hvert enkelt av de ni peptidene vist i tabell 5.1 ble veid inn og løst i destillert vann til 2 mg/ml. Løsningene ble oppbevart ved -25 °C, beskyttet mot lys.

5.4.2 Standardløsninger

Like deler av hver enkelt stamløsning på 2 mg/ml ble blandet sammen og fortynnet med destillert vann til en peptidkonsentrasjon på 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. For eksperimentene i underavsnitt 6.2.1 ble like deler av fire stamløsninger (angiotensin 1, neurotensin, endomorfin og enkefalin) på 2 mg/ml, blandet sammen og fortynnet med destillert vann til en peptidkonsentrasjon på 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Standardløsningene ble oppbevart ved -25 °C, beskyttet mot lys.

5.4.3 Prøveløsninger

Det ble laget nye prøveløsninger ved hvert forsøk ved å fortynne standardløsning til ønsket konsentrasjon, typisk 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eller 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. De tillagede prøveløsningene fungerte som donorløsninger i ekstraksjonsforsøkene. Det ble benyttet ulike væsker til fortynning av standardløsning avhengig av hvilke forsøk som ble utført:

1 mM HCl, pH 3.0:

8.28 ml HCl, 37 % (w/w), ble fortynnet med destillert vann til et totalvolum på 100 ml og en konsentrasjon på 1 M. 1 mM HCl-løsning ble tillaget ved videre fortynning av 1 M løsning.

25 mM ammoniumformatbuffer, pH 4.1:

0.1 M HCOOH ble titrert med 0.1 M NH₃ til pH 4.1. Løsningen ble deretter fortynnet med destillert vann til en bufferstyrke på 25 mM.

25 mM ammoniumformatbuffer, pH 5.0:

0.1 M HCOOH ble titrert med 0.1 M NH₃ til pH 5.0. Løsningen ble deretter fortynnet med destillert vann til en bufferstyrke på 25 mM.

25 mM fosfatbuffer, pH 6.1:

1.73 g NaH₂PO₄·H₂O ble veid ut og løst i destillert vann til et totalvolum på 500 ml. 4.47 g Na₂HPO₄·12H₂O ble veid ut og løst i destillert vann til et totalvolum på 500 ml. NaH₂PO₄-løsningen ble deretter titrert med Na₂HPO₄-løsningen til pH 6.1.

10 mM fosfatbuffer, pH 7.4:

1.79 g Na₂HPO₄·12H₂O ble veid ut og løst i destillert vann til et totalvolum på 500 ml. Deretter ble 0.28 g NaH₂PO₄·H₂O veid ut og løst i destillert vann til et totalvolum på 200 ml. Na₂HPO₄-løsningen ble deretter titrert med NaH₂PO₄-løsningen til pH 7.4.

10 mM NaOH, pH 12.0:

Tillaging av 100 mM: 1 g NaOH ble veid ut og fortynnet med destillert vann til 250 ml. Ved tillaging av 10 mM NaOH, ble løsningen fortynnet ti ganger med destillert vann.

5.4.4 Prøveløsninger til stabilitetsforsøk

Forsøk med sur løsning: 1 M HCl ble fortynnet med destillert vann til 100 mM. Deretter ble én del 100 mM HCl blandet med én del standardløsning til en peptidkonsentrasjon på 100 µg/ml.

Forsøk med nøytral løsning: én del 10 mM fosfatbuffer pH 7.4 ble blandet med én del standardløsning til en peptidkonsentrasjon på 100 µg/ml.

Forsøk med basisk løsning: 100 mM NaOH-løsning ble fortynnet med destillert vann til 20 mM NaOH. Deretter ble én del 20 mM NaOH blandet med én del standardløsning til en peptidkonsentrasjon på 100 µg/ml.

5.4.5 Prøveløsninger med transportmolekyler

I forsøket med sulfonsyrene 1-heksansulfonatmonohydrat (Na-salt), 1-nonansulfonsyre (Na-salt) og 1-undekansulfonsyre (Na-salt) som transportmolekyler, ble disse blandet direkte i donorløsning pH 3.0, i konsentrasjonen 50 mM.

5.4.6 Akseptorløsninger

50 mM HCl, pH 1.3:

8.28 ml HCl, 37 % (w/w), ble fortynnet med destillert vann til et totalvolum på 100 ml og en konsentrasjon på 1 M. 50 mM HCl-løsning ble tillaget ved videre fortynning av 1 M løsning.

10 mM fosfatbuffer, pH 7.4:

1.79 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ble veid ut og løst i destillert vann til et totalvolum på 500 ml. Deretter ble 0.28 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ veid ut og løst i destillert vann til et totalvolum på 200 ml. Na_2HPO_4 -løsningen ble deretter titrert med NaH_2PO_4 -løsningen til pH 7.4.

10 mM NaOH, pH 12.0:

Tillaging av 100 mM: 1 g NaOH ble veid ut og fortynnet med destillert vann til 250 ml. Ved tillaging av 10 mM NaOH ble denne løsningen fortynnet ti ganger med destillert vann.

5.4.7 Organiske faser

1-oktanol:IBK:DEHP

1-oktanol, diisobutylketon (IBK) og DEHP ble veid ut og blandet i forholdet 55:35:10 (w/w).

1-oktanol:15-crown-5-ether

1-oktanol og 15-crown-5-ether (15-crown-5) ble veid ut og blandet i forholdet 95:5 (w/w).

Eugenol

Eugenol, 99 %, ble benyttet som rensubstans.

Transportmolekyler

De organiske fasene med ulike transportmolekyler ble tillaget ved å veie ut 1-oktanol, IBK og ønsket transportmolekyl i forholdet 55:35:10 (w/w). Transportmolekyler som ikke løste seg til 10 %, ble tilsatt til metning.

TOPO

Tri-*n*-oktylfosfinoksid (TOPO) ble veid ut og tilsatt ønsket organisk fase i konsentrasjonen 5 mM.

Tris-2-etylheksylfosfat

Tris-2-etylheksylfosfat ble veid ut og tilsatt ønsket organisk fase i konsentrasjonen 5 mM.

Karboksylsyrer

De ulike organiske fasene ble tillaget ved å blande 1-oktanol:IBK i forholdet 60:40 (w/w); deretter ble ønsket karboksylsyre tilsatt til metning.

5.4.8 Strømmålinger

Det ble foretatt strømmålinger i forsøkene beskrevet i avsnitt 6.2 til 6.5. Målingene ble gjort ved at selve spenningskilden ble koblet til en PC med programvare for måling av strøm. Tidligere forsøk har vist at strømstyrken bør ligge under 450 μA [14].

5.4.9 Kjemikalier

Tabell 5.4-1 viser en oversikt over kjemikalier brukt ved tillaging av donorløsninger, akseptorløsninger, organiske faser, buffere og separasjonsbuffer, mens tabell 5.4-2 viser en oversikt over transportmolekyler, deres kvalitet og produksjonssted.

Tabell 5.4-1: Oversikt over kjemikalier brukt ved tillaging av donorløsninger (inklusive sulfonsyrer), akseptorløsninger, organiske faser, buffere og separasjonsbuffere.

Kjemikalie	Kvalitet	Produsent
1-oktanol	~ 99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Diisobutylketon (IBK)	Teknisk, 80 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Natriumdihydrogenfosfatmonohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Pro analysii	Merck (Damstadt, Tyskland)
Dinatriumhydrogenfosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	Pro analysii	Merck (Damstadt, Tyskland)
Saltsyre (HCl)	Pro analysii, 37 %	Merck (Damstadt, Tyskland)

Orto-fosforsyre (H_3PO_4)	Pro analysii, 85 %	Merck (Damstadt, Tyskland)
Eugenol	99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Tri- <i>n</i> -oktylfosfinoksid	Ukjent	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Natriumhydroksid (NaOH)	Analytical reagent	VWR International (Radnor, PA, USA)
Ammoniakk (NH_3)	Konsentrert	Merck (Damstadt, Tyskland)
Maursyre (HCOOH)	98-100 %	Merck (Damstadt, Tyskland)
1-Heksansulfonatmonohydrat (Na-salt)	Puriss	Fluka Chemie GmbH (Buchs, Sveits)
1-Nonansulfonsyre (Na-salt)	Puriss	Fluka Chemie GmbH (Buchs, Sveits)
1-Undekansulfonsyre (Na-salt)	Puriss	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
15-crown-5-ether	Ukjent	Fluka Chemie GmbH (Buchs, Sveits)

Tabell 5.4-2: Oversikt over transportmolekyler, kvalitet og produksjonssted

Kjemikalie	Kvalitet	Produsent
Di(2-etylheksyl)fosfat (DEHP)	Ukjent	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Tridecylfosfat (TDP)	Teknisk	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Tetrabutylammoniumbromid	Ukjent	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Tetraheksylammoniumbromid	99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Diheksadecylfosfat	Ukjent	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Tris(2-butoksyetyl)fosfat	94 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Bis(4-nitrofenyl)fosfat	99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Triisopropylfosfat	95 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Dibutylfosfat	Teknisk	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)

Eksperimentelt

2-Nitrofenyloktyleter	GC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Tributylfosfat	Ukjent	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Tri(8-quionlyl)fosfat	≥ 98 %	Fluka (Buchs, Sveits)
Tri-tert-butylborat	98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Stearinsyre (Na-salt)	> 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Tris-2-etylheksylfosfat	> 98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Kaprylsyre	> 98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Trietylfosfat	> 98 %	Fluka (Buchs, Sveits)
Trixylylfosfat	> 98 %	Fluka (Buchs, Sveits)
Fenylborsyre	> 97 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
1-Naftalenkarboksylsyre	96 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Trifenylfosfat	98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
2.6-Naftalendikarboksylsyre	99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Difenylddiksyre	99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Para-aminobensosyre	99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
1.2-Bensendikarboksylsyre	Ukjent	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
1.9-Nonandikarboksylsyre	Puriss	Fluka Chemie GmbH (Buchs, Sveits)

5.5 Beregning av utbytte

Formel 5.5 viser hvordan utbyttet ble beregnet [10].

$$Utbytte (\%) = \frac{n_a}{n_s} \cdot 100 \% = \frac{V_a C_a}{V_s C_s} \cdot 100 \%$$

Formel 5.5: Beregning av utbytte

n_a og n_s er henholdsvis stoffmengden i akseptorløsning etter endt ekstraksjon, og stoffmengden i donorløsning før ekstraksjon fant sted. V_a og C_a er volum og konsentrasjon i akseptorløsningen etter endt ekstraksjon, mens V_s og C_s er volum og konsentrasjon i donorløsningen før ekstraksjon.

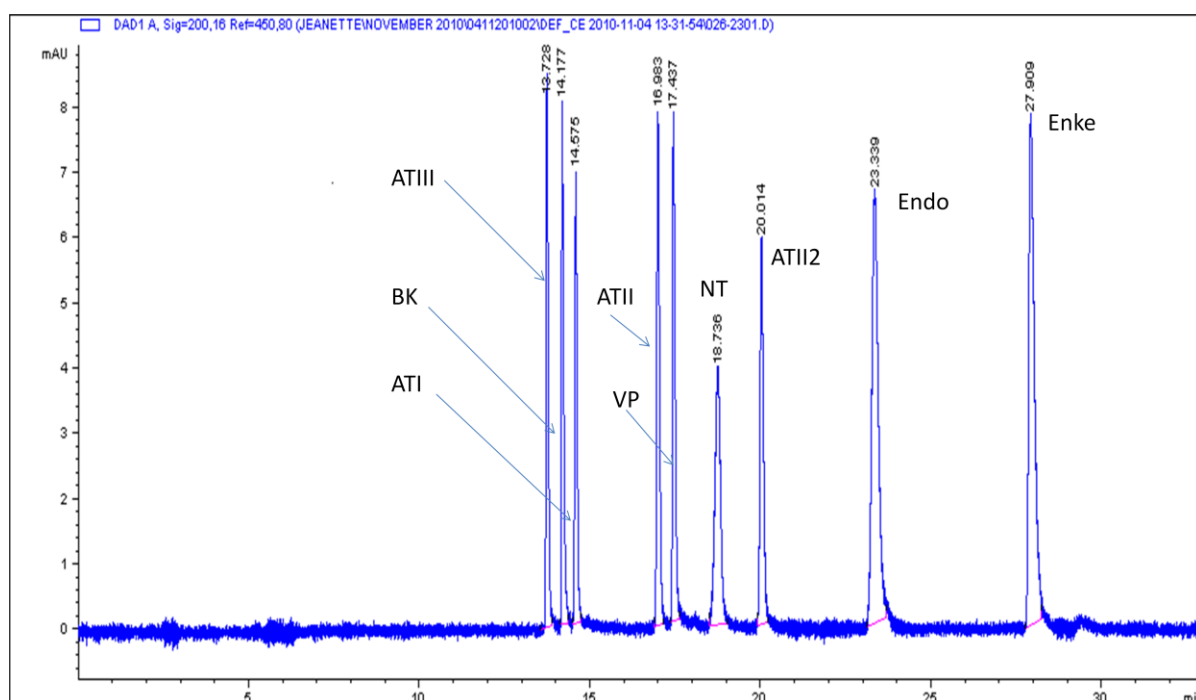
6. Resultater og diskusjon

Tiden etter at EME ble introdusert i 2006 ble det utført en rekke arbeider for å optimalisere utbytte og renhet fra biologiske prøver. Variasjoner i spenningsnivå, ekstraksjonstid, organisk fase, agitasjon og temperatur har blitt undersøkt og videreført. På denne måten har kunnskapen om EME blitt utviklet i analyselaboratoriet [11, 13-15]. I dette arbeidet var det ønskelig å undersøke mulighetene for å oppnå en mer selektiv ekstraksjon av peptider ved å utnytte pH-betingelsene på en annen måte enn tidligere. Resultatene fra disse forsøkene er vist i avsnitt 6.2. Det ble også undersøkt om ekstraksjonsutbyttene kunne økes ved å tilsette ulike transportmolekyler. Sistnevnte er vist i avsnitt 6.3 til 6.5.

6.1 Innledende forsøk

6.1.1 Peptidenes migrasjonsrekkefølge i CE

I kapillærelektroforese er forholdet mellom molekylstørrelse og ladning avgjørende for migrasjonshastigheten. Små forbindelser med flere positive ladninger vil teoretisk sett migrere raskere i det elektriske feltet enn store forbindelser med kun én positiv ladning. Det er imidlertid vanskelig å gjøre en kvalifisert bedømming av migrasjonsrekkefølgen basert på teori alene, derfor ble det utført eksperimentelle forsøk for å finne rekkefølgen. Referanseløsningen ble tillaget ved å fortynne standardløsning med 1 mM HCl pH 3.0, til 10 µg/ml. Løsningene med enkeltpeptider ble tillaget ved å fortynne hver av de ni stamløsningene med destillert vann, til en peptidkonsentrasjon på 10 µg/ml. Samtlige løsninger ble analysert i CE. Figur 6.1-1 viser peptidenes migrasjonsrekkefølge i CE.



Figur 6.1-1: Elektroferogram – peptidenes rekkefølge i CE.
X-aksen viser migrasjonstid (min) og Y-aksen viser detektorsignal (mAU).

Tabell 6.1-1: Peptidenes migrasjonsrekkefølge i CE, nettoladning ved pH 2.75 og molekylvekt.

Faktisk rekkefølge	Nettoladning pH 2.75 ¹	Molekylvekt (Mw)
1) ATIII	+2	931.1
2) BK	+2	1060.2
3) ATI	+3	1296.5
4) ATII	+2	1046.2
5) VP	+2	1086.3
6) NT	+3	1673.0
7) ATII2	+1	899.0
8) Endomorfin	+1	610.7
9) Enkefalin	0	555.6

1) Kilde: [26]

Peptidenes migrasjonsrekkefølge i CE ble bestemt ved å sammenligne migrasjonstidene i referanseelektroferogrammet, med migrasjonstidene for hvert enkelt peptid. Tabell 6.1-1 viser den faktiske migrasjonsrekkefølgen, peptidenes ladning ved pH 2.75 samt deres molekylvekt. I CE separeres analyttene basert på forholdet mellom størrelse og ladning. Ved beregning av dette forholdet, avviker imidlertid den eksperimentelle migrasjonsrekkefølgen noe fra den teoretiske. Dette skyldes sannsynligvis at molekylvekten ikke er synonym med peptidets romlige størrelse som kan utvise mer, eller mindre, væskemotstand enn vekten tilsier. Peptidenes migrasjonsrekkefølge i CE ble brukt som identitetsmarkør i de øvrige forsøkene.

6.1.2 Løsningens stabilitet

Etter hver ekstraksjon ble akseptorfasen, og eventuelt donorfasen, overført til autosamplervialer som deretter ble plassert i CE-apparatet. Fra det tidspunkt vialene ble plassert i CE-apparatet til analysen fant sted, kunne det gå opp til 24 timer. Derfor var det viktig å fastslå løsningenes stabilitet i dette tidsrommet. Det ble utført to ulike forsøk. I det første forsøket var målet å se om noe av vannfasen fordampet i løpet av 24 timer. Betydelig fordampning vil gi endring i peptidkonsentrasjonen og dermed falske svar ved beregning av utbytte. For å undersøke dette ble 50.0 µl standardløsning pipettert over i en autosamplervial, lokket ble satt på, og deretter ble vialen innveid på analysevekt. Vialen ble så plassert i CE-apparatet der den fikk stå beskyttet mot lys, ved romtemperatur. Etter 24 timer ble vialen veid på ny. Det ble utført to paralleller av dette forsøket.

Tabell 6.1-2: Fordampningstest, 24 timer

	Vekt (mg):	Vekt (mg) e. 24 t:	Diff. (mg):	Diff. (µl):	Gj.sn.diff. (µl):
Vial 1, 50.0 µl	1858.54	1856.18	2.36	2.36	2.23
Vial 2, 50.0 µl	1843.65	1841.56	2.09	2.09	

Løsningen stod beskyttet mot lys, ved romtemperatur

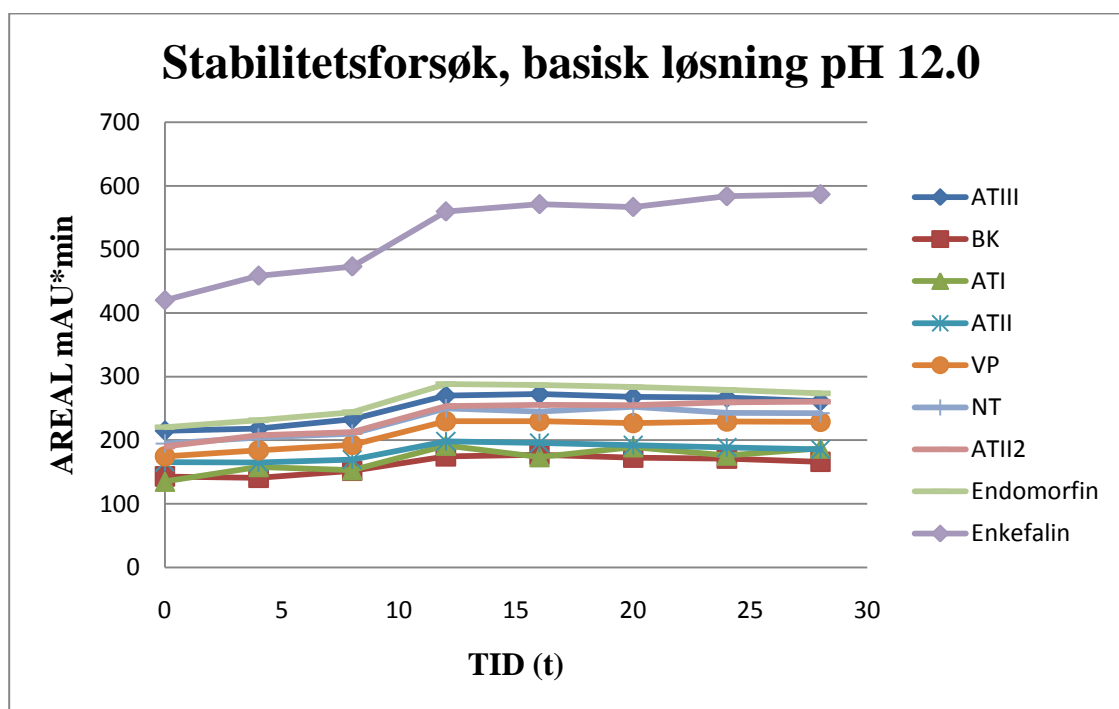
Tabell 6.1-2 viser at 2.23 µl væske hadde fordampet i løpet av 24 timer; med andre ord hadde væskevolumet i vialen blitt redusert til $(50.0 - 2.23 \text{ µl}) = 47.8 \text{ µl}$, med påfølgende forandring i peptidkonsentrasjon:

Hvis peptidenes utgangskonsentrasjon var 10 µg/ml ville mengden peptider i 50.0 µl løsning være $((10.0 \text{ µg}/1000 \text{ µl}) * 50.0 \text{ µl}) = 0.5 \text{ µg}$. Peptidkonsentrasjonen etter fordampning ville da

bli $(0.5 \mu\text{g}/0.048 \text{ ml}) = 10.4 \mu\text{g}/\text{ml}$. Konsentrasjonsøkningen vil tilsvare $((10.4 - 10.0) = 0.4)$, $(0.4/10.0 * 100)) = 4 \%$.

Da nøyaktige utbytteberegninger ikke var avgjørende for videre arbeid, ble fordampningstesten vurdert som tilfredsstillende selv med en teoretisk konsentrasjonsøkning på 4 % over 24 timer.

I det andre forsøket ble peptidenes stabilitet undersøkt. Det ble tillaget tre prøveløsninger ved å fortynne standardløsning med henholdsvis 100 mM HCl, 20 mM NaOH og 10 mM fosfatbuffer pH 7.4, til en peptidkonsentrasjon på 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Prøveløsningene ble deretter analysert i sykluser på ca fire timer, over en periode på totalt 28 timer. Forsøkene ble utført ved romtemperatur og prøvene var beskyttet mot lys. Etter analysen ble de ulike elektroferogrammene sammenlignet for å oppdage eventuell nedgang i areal over tid. Dette er vist i figur 6.1-2 for peptider i basisk løsning (pH 12.0). Det samme mønsteret ble sett for peptider i sur løsning (pH 1.3) og nøytral løsning (pH 7.4).



Figur 6.1-2: Stabilitetsforsøk for peptider i basisk løsning, pH 12.0.
Analysene ble utført hver 4. time over totalt 28 timer. Peptidløsningene stod beskyttet mot lys og i romtemperatur.

Figur 6.1-2 viser elektroferogramets topparealer som funksjon av tid. Ettersom arealet til hver topp i et elektroferogram er proporsjonalt med konsentrasjon av analytt i prøven, vil en

nedgang i areal representere en nedgang i analyttkonsentrasjon. Figur 6.1-2 viser at konsentrasjonene økte etter at ti timer hadde passert. Årsaken til dette kan være at noe av vannfasen hadde fordampet. Det ble imidlertid ikke foretatt en statistisk vurdering av hvorvidt økningen i areal var signifikant, da dette ikke ble ansett som påkrevet for videre forsøk. Under analysene ble det verken registrert carry-over eller ukjente topper i elektroferogrammene. På grunnlag av disse forsøkene ble peptidenes stabilitet over 28 timer vurdert som tilfredsstillende for dette arbeidet.

6.2 Selektive ekstraksjonsutbytter basert på peptidenes kjemiske egenskaper

6.2.1 Valg av organisk fase

Som vist i formel 4.2-1 påvirkes massetransporten av analyttens konsentrasjonsgradient over den kunstige væskemembranen. Konsentrasjonsgradienten vil delvis bestemmes av analyttens fordelingskoeffisient mellom prøven og den organiske fasen. Hvis det benyttes en organisk fase inn i hvilken analyttens fordeling er høy, kan dette øke utbyttet. Økt utbytte forutsetter imidlertid at analytten ikke fanges i den organiske fasen, uten fordeles videre inn i akseptorfasen. Endring i organisk fase vil også endre analyttens diffusjonskoeffisient. Valg av organiske faser som nedsetter diffusjonen, vil gi en nedgang i massetransporten som vist i formel 4.2-1.

Det var ønskelig å finne den organiske fasen som ville ekstrahere over flest av modellpeptidene, gjerne kombinert med høyt utbytte. En slik organisk fase ville gi det beste utgangspunktet i de videre forsøkene med å undersøke den selektive ekstraksjonen basert på pH-endringer. Det ble valgt å teste tre ulike organiske faser som hadde vist positive resultater i tidligere arbeider med EME av peptider [13]. De tre valgte organiske fasene var eugenol, som er en polar olje, 1-oktanol:15-crown-5 (95:5) og 1-oktanol:IBK:DEHP (55:35:10). 15-crown-5 og DEHP ble tilsatt for å danne hydrofobe kompleks med peptidene. IBK ble tilsatt for å senke strømmen i systemet [14].

Det ble utført to ulike forsøk: ett med 50 mM HCl pH 1.3, i akseptorfasen og ett med fosfatbuffer pH 7.4, i akseptorfasen. Det ble valgt fire modellpeptider: angiotensin 1 (ATI), enkefalin, neurotensin (NT) og endomorfin. Standardløsning med de fire peptidene ble fortynnet med fosfatbuffer pH 7.4, til en prøveløsning med konsentrasjon på 10 µg/ml. Det

ble utført to paralleller med hver og en av de tre ulike organiske fasene. Ekstraksjonen pågikk i fem minutter, med en spenning på 10 volt og en vibrasjonshastighet på 900 rpm.

Tabell 6.2-1: Sammenligning av ekstraksjoner utført med de tre ulike organiske fasene eugenol, 1-oktanol:IBK:DEHP og 1-oktanol:15-crown-5.

	Utbytte %				Utbytte %			
	donor pH 7.4/akseptor pH 1.3				donor pH 7.4/akseptor pH 7.4			
	ATI	NT	Endo	Enke	ATI	NT	Endo	Enke
EUGENOL	0	0	6	3	0	5	6	0
1-okt:IBK:DEHP	25	38	24	22	0	8	7	0
1-okt:15-crown-5	0	0	0	0	0	0	3	0

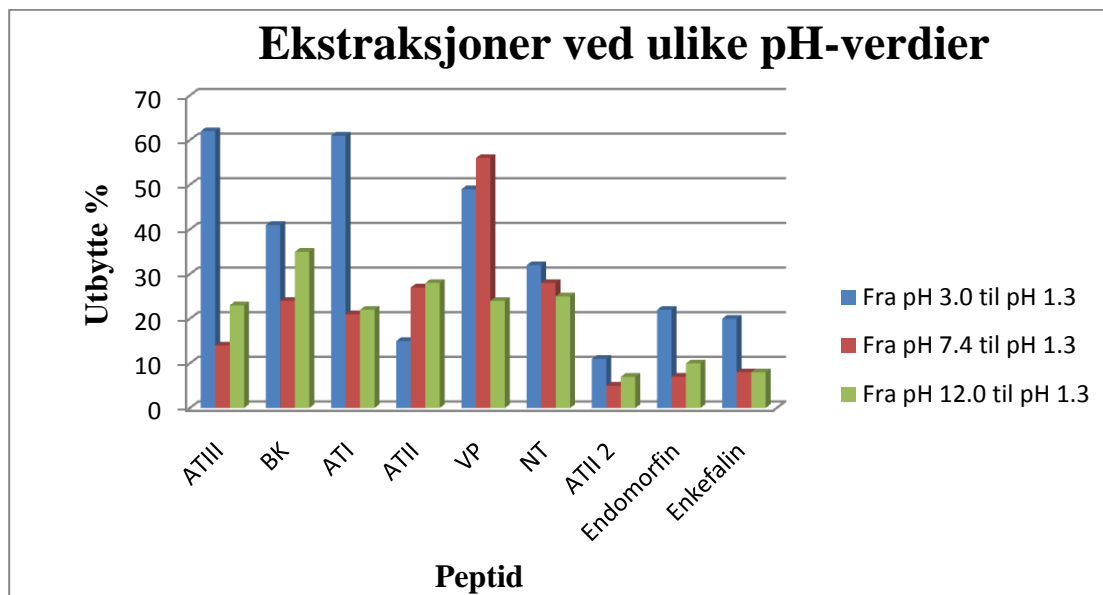
I det første forsøket ble ekstraksjonene utført fra pH 7.4 i donor til pH 1.3 i akseptor. I det andre forsøket ble ekstraksjonene utført fra pH 7.4 i donor til pH 7.4 i akseptor. Elektrisk potensial: 10 V, Ekstraksjonstid: 5 minutter, Agitasjon: 900 rpm

Tabell 6.2-1 viser at 1-oktanol:15-crown-5 kun ekstraherte over ett av fire peptider i forsøket fra pH 7.4 til pH 7.4. Den samme organiske fasen ekstraherte ikke over noen av peptidene i forsøket fra pH 7.4 til pH 1.3. Eugenol fungerte bedre, og ga tilnærmet lik de samme ekstraksjonsutbyttene ved de to ulike forsøkene. 1-oktanol:IBK:DEHP var den fasen som ga de beste resultatene og det var derfor naturlig å fortsette med denne fasen i de kommende forsøkene. Selv om ikke eugenol ga like gode resultater som 1-oktanol:IBK:DEHP, var det ønskelig å gjøre flere forsøk med eugenol for å se om den kunne utvise selektivitet overfor visse peptider.

6.2.2 Ulike pH-betingelser

Som tidligere nevnt er peptider zwitterioner noe som innebærer at de kan ha både positiv og negativ ladning. For at peptidene skal migrere fra anoden i donorløsningen til katoden i akseptorløsningen er det en forutsetning at de bærer positiv ladning. Peptidenes positive ladning er også avgjørende for kompleksdannelsen med DEHP (se underavsnitt 4.2.1). I dette forsøket ble det undersøkt om peptidene ville forbli i donorløsningen hvis deres nettoladning var null. Ettersom nettoladningen til et peptid er null ved peptidets pI-verdi, kunne denne verdien brukes som en indikasjon på hvilke peptider som ville ekstraheres ved en bestemt pH-verdi i donorløsningen. Hypotesen var at peptidet ville forbli i donorfasen hvis pH-verdien var den samme som, eller høyere enn peptidets pI-verdi. For å teste denne hypotesen ble det utført tre ulike forsøk, alle med 1-oktanol:IBK:DEHP (55:35:10) som

organisk fase og 50 mM HCl pH 1.3, som akseptorfase men med ulike donorfaser. Donorfasene ble tillaget ved at standardløsning ble fortynnet med henholdsvis 1 mM HCl pH 3.0, fosfatbuffer pH 7.4 og 10 mM NaOH pH 12.0, til en peptidkonsentrasjon på 10 µg/ml. Det ble utført tre paralleller hver med de ulike donorfasene. Ekstraksjonene fikk pågå i fem minutter med en spenning på 10 volt og en agitasjon på 900 rpm.



Figur 6.2-1: Ekstraksjoner med oktanol:IBK:DEHP ved pH 3.0, pH 7.4 og pH 12.0 i donorløsningen.

Elektrisk potensial: 10 V, Ekstraksjonstid: 5 minutter, Agitasjon: 900 rpm, væskemembran: 1-Oktanol:IBK:DEHP

Da ingen av peptidene har pI-verdi lavere enn 3 (se tabell 5.1), ble det forventet at samtlige peptider ville ekstraheres over ved pH 3.0 i donorfase. De eksperimentelle forsøkene vist i figur 6.2-1, kunne bekrefte at alle peptidene ble ekstrahert ved pH 3.0.

I det andre forsøket var pH i donorfase 7.4. Angiotensin-2-antipeptid (ATII2) og enkefalin har pI-verdi under 7.4, noe som innebærer at de har negativ nettoladning ved denne pH-verdien. Det ble forventet at disse peptidene ikke ville ekstraheres over til katoden i akseptorfase ved nøytral pH i donorfase. Det var imidlertid ikke mulig å bekrefte denne teorien i praksis. For ATII2 og enkefalin, med pI-verdier på 5.1 respektive 5.9 (se tabell 5.1), ble utbyttene redusert til ca halvparten sammenlignet med ekstraksjonsutbyttene fra sur donorfase (pH 3.0). Imidlertid ble også utbyttene for NT, angiotensin 3 (ATIII), bradykinin (BK), ATI og endomorfin redusert; mens utbyttene for angiotensin 2 (ATII) og vasopressin (VP) økte noe.

I det tredje forsøket bestod donorfasen av 10 mM NaOH som har en pH på 12.0. Av de ni peptidene som ble brukt i dette arbeidet er det kun BK som har en pI-verdi over 12. Teoretisk sett skulle kun BK ekstraheres over ved disse betingelsene. Figur 6.2-1 viser imidlertid at samtlige peptider ble ekstrahert selv ved basiske betingelser i donorfasen.

Resultatene fra de tre forsøkene kunne ikke bekrefte hypotesen om selektiv ekstraksjon av peptider basert på deres pI-verdier. For noen av peptidene økte utbyttene ved høyere pH og dette kan forklares med at peptidenes fordeling i den organiske fasen endres ved endrede pH-betingelser. Reduserte utbytter ved høyere pH forklares med at peptidene har færre positive ladninger ved høy pH enn ved lav. Dette vil redusere den elektrokinetiske migrasjonen så vel som kompleksdannelsen med DEHP. Hypotesen gikk imidlertid ut på at ekstraksjonen ville blokkeres totalt ved pH-verdier over peptidenes pI-verdier. En av grunnene til at dette ikke inntreffer kan være tilstedeværelsen av aminosyren arginin (R). Arginin finnes i ATIII, BK, ATI, ATII, VP og NT, og har en pKa-verdi på 12.5 [27]. I teorien skulle denne aminosyren, selv ved pH 12.0, kunne danne et kompleks med DEHP med påfølgende transport av peptidet. I tillegg til to arginin, inneholder NT også aminosyren lysin (K) som har en pKa-verdi på 10.5 [27]. Disse tre aminosyrene er ladede selv i det øvre pH-området og dette kan være en forklaring på at utbyttet til NT holdt seg relativt stabilt i de tre forsøkene.

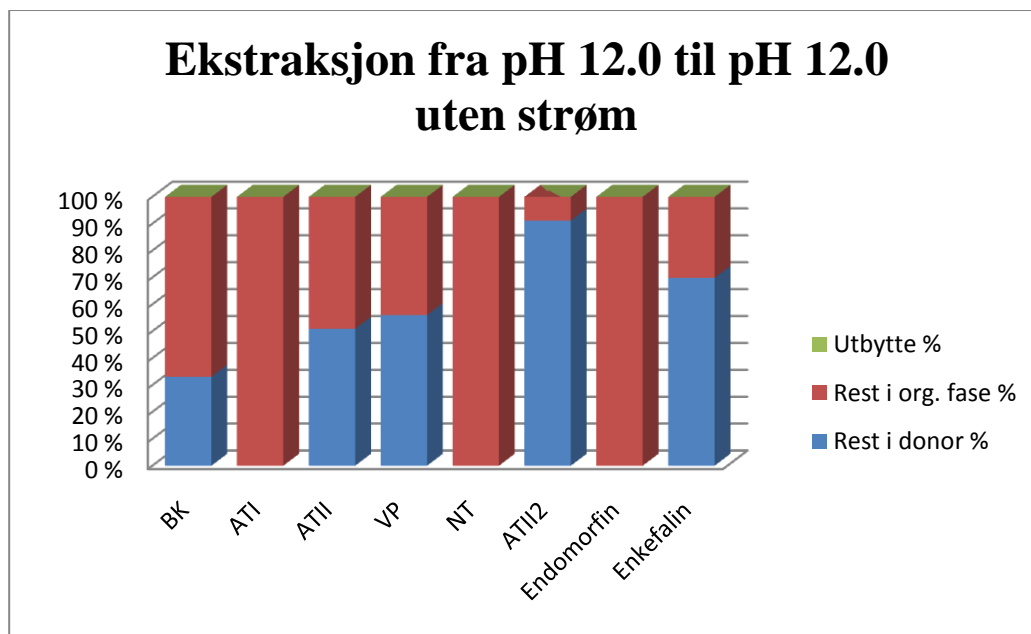
I disse forsøkene var det sure betingelser (pH 1.3) på akseptorsiden av membranen. Peptidene fikk således tilbake sin positive nettoladning i overgangen mellom den organiske fasen og akseptorløsningen, og kunne med dette trekkes videre mot katoden. Ved basiske betingelser både i donor- og akseptorfasen vil imidlertid peptidene (bortsett fra BK) ha negativ nettoladning i hele systemet. For å få svar på om slike betingelser helt vil blokkere for ekstraksjon, ble det utført tre paralleller med basisk pH i både donor- og akseptorfase. Øvrige ekstraksjonsbetingelser var de samme som tidligere.

Tabell 6.2-2: Utbytte for ekstraksjoner utført fra pH 12.0 til pH 1.3 og fra pH 12.0 til pH 12.0.

	UBYTTE %								
	ATIII	BK	ATI	ATII	VP	NT	ATII2	Endo.	Enke.
Fra pH 12.0 til pH 1.3	23	35	22	28	24	25	7	10	8
Fra pH 12.0 til pH 12.0	8	7	5	18	8	9	3	7	4

Elektrisk potensial: 10 V, Ekstraksjonstid: 5 minutter, Agitasjon: 900 rpm, Væskemembran: 1-Oktanoll:IBK:DEHP

Tabell 6.2-2 viser en sammenligning av utbyttene i forsøkene med EME av peptider fra basisk (pH 12.0) til sur (pH 1.3), og fra basisk (pH 12.0) til basisk (pH 12.0) løsning. Selv med negativ nettoladning i hele systemet ble peptidene ekstrahert fra anoden til katoden; riktignok med lavere utbytter enn ved sure betingelser i akseptorfasen. Grunnen til at dette inntreffer kan være at peptidene ikke er fullstendig deprotonerte, og at de fortsatt har positivt ladede grupper selv ved basisk pH 12.0. Spørsmålet blir hvorvidt ekstraksjonen styres av strømmen, eller av passiv diffusjon og fordeling ved hjelp av DEHP. Dette ble undersøkt i neste forsøk ved å utføre tre parallelle ekstraksjoner fra basisk til basisk miljø uten pålagt spenning.



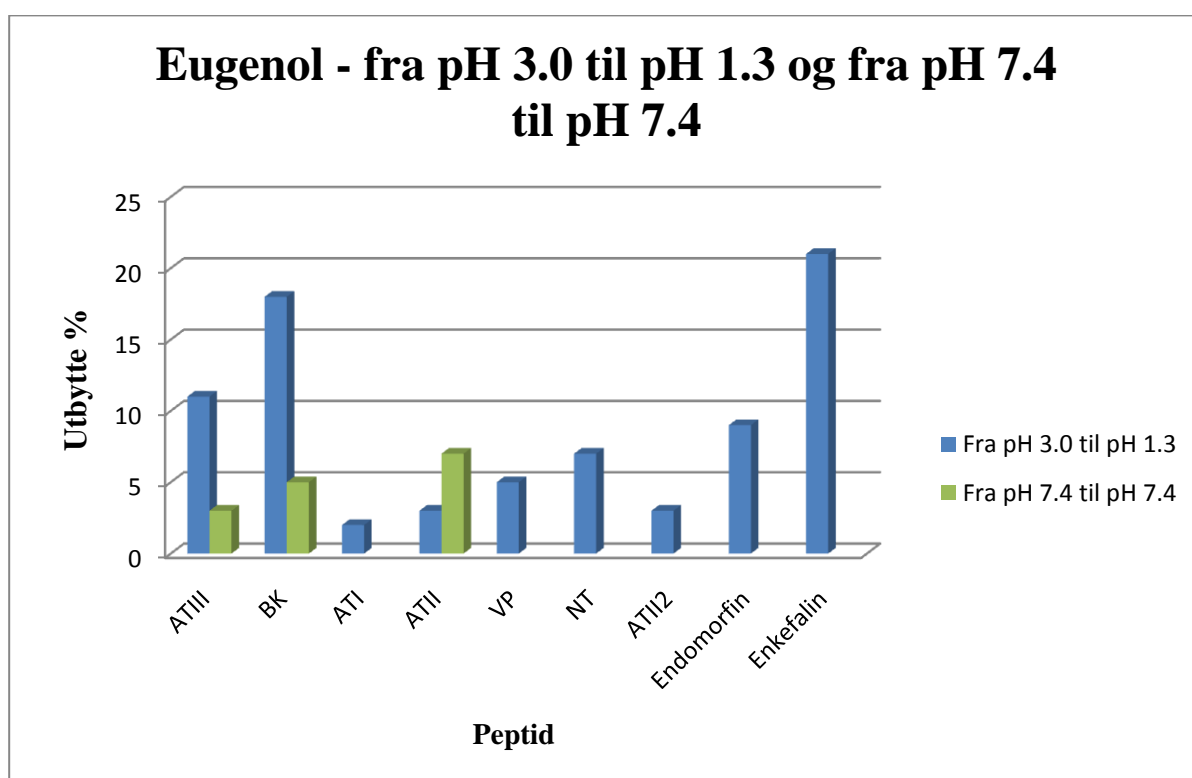
Figur 6.2-2: Ekstraksjon fra pH 12.0 i donor til pH 12.0 i akseptor uten strøm i systemet. ATIII er ekskludert grunnet usikkert resultat.

Elektrisk potensial: 0 V, Ekstraksjonstid: 5 minutter, Agitasjon: 900 rpm, Væskemembran: 1-oktanoll:IBK:DEHP (55:35:10)

Figur 6.2-2 viser at etter fem minutters ekstraksjon uten pålagt spenning, ble det ikke detektert noen peptider i akseptorfasen. Imidlertid ble alle peptidene, i varierende grad,

fordelt inn i den kunstige væskemembranen. Dette tyder på at peptidene, selv uten strøm, kommer over i den organiske fasen i løpet av fem minutter. For videre massetransport fra den organiske fasen, inn i akseptorfasen, ser det ut til at strømmen i systemet er en nødvendig drivkraft.

I neste forsøk ble det undersøkt om eugenol som organisk fase kunne være bedre egnet for selektivitetseksperimenter basert på variasjoner i pH. Det ble utført tre paralleller fra pH 3.0 i donorfase til pH 1.3 i akseptorfase, og tre paralleller fra pH 7.4 i donorfase til pH 7.4 i akseptorfase, med de samme ekstraksjonsbetingelsene som i forsøkene med strøm.



Figur 6.2-3: Ekstraksjoner med eugenol fra pH 3.0 til pH 1.3 og fra pH 7.4 til pH 7.4.
Elektrisk potensial: 10 V, Ekstraksjonstid: 5 minutter, Agitasjon: 900 rpm, Væskemembran: Eugenol

Ved pH 7.4 vil nettoladningen til enkefalin og ATII2 være negativ. Det forventes derfor ikke at disse skal migrere i det elektriske feltet mot katoden i akseptorløsningen. Som vist i figur 6.2-3 ble riktignok ikke disse peptidene ekstrahert ved pH 7.4. Det er imidlertid vanskelig å si hvorvidt blokkeringen skyldes peptidenes negative nettoladning, ettersom peptider med positiv nettoladning også ble blokkert i dette systemet. Sannsynligvis er det avgjørende for peptidenes elektrokinetiske migrasjon hvor sterk nettoladningen er. Selv om nettoladningen er positiv ved pH 7.4, er den mindre positiv enn ved pH 3.0. Det som da kan inntreffe er at

den elektriske drivkraften blir svakere enn peptidenes interaksjoner med donorfasen eller med den organiske fasen, og dermed når ikke peptidene frem til katoden i akseptorfasen.

6.3 Effekt av ulike transportmolekyler

Som beskrevet i teoridelen er sammensetningen av væskemembranen avgjørende for en vellykket ekstraksjon. I dette arbeidet ble de ulike organiske fasene 1-oktanol:15-crown-5, eugenol og 1-oktanol:IBK:DEHP sammenlignet og det ble vist at sistnevnte ga det beste ekstraksjonsutbyttet. Også tidligere arbeider har vist at tilsetning av DEHP gir økte utbytter [15]. Utbytterne er imidlertid relativt lave og disse må økes for at EME som teknikk skal vinne større oppslutning. For å undersøke om ekstraksjonsutbyttet kunne forbedres, ble det utført en såkalt screeninganalyse av 20 forskjellige transportmolekyler. Disse transportmolekylene kan på ulike måter danne hydrofobe kompleks med peptidene og således forenkle transporten gjennom den organiske fasen.

6.3.1 Screeninganalyse

Prøveløsningene ble laget ved å fortynne standardløsning med 1 mM HCl pH 3.0, til en peptidkonsentrasjon på 20 µg/ml. Det ble tillaget 20 ulike organiske faser bestående av 1-oktanol:IBK:transportmolekyl, 55:35:10 (w/w). 50 mM HCl pH 1.3, utgjorde akseptorfasen. Det ble utført to paralleller av hver ekstraksjon med en pålagt spenning på 10 volt. Ekstraksjonene fikk pågå i fem minutter med en agitasjon på 900 rpm. Både donor og akseptorfasen ble analysert med hjelp av CE. Det ble også utført et referanseforsøk med kun 1-oktanol:IBK (60:40), som organisk fase. Dette forsøket ble utført i to paralleller, under samme ekstraksjonsbetingelser som de øvrige ekstraksjonene.

Som vist i tabell 6.3-1 ga ingen av de to alkylerte ammoniumbromidene noen ekstraksjonsutbytter. Forklaringen til dette er sannsynligvis transportmolekyleneles ladning som er positiv (se vedlegg I). Ettersom peptidene ved pH 3.0 vil ha positive ladninger, vil de ikke danne ioniske interaksjoner med de positivt ladede ammoniumbromidene. I tabell 6.3-1 fremkommer det at 16 av transportmolekylene kun ekstraherte over 2 eller 3 peptider. Enkefalin og endomorfin var å finne i samtlige av disse ekstraksjonene. Disse to peptidene ble imidlertid også ekstrahert uten transportmolekyler i referanseforsøket med 1-oktanol:IBK (60:40). Det som skiller disse to peptidene fra de øvrige syv er størrelsen og hydrofobisiteten. Da dette er de to minste og mest hydrofobe peptidene, vil sannsynligvis

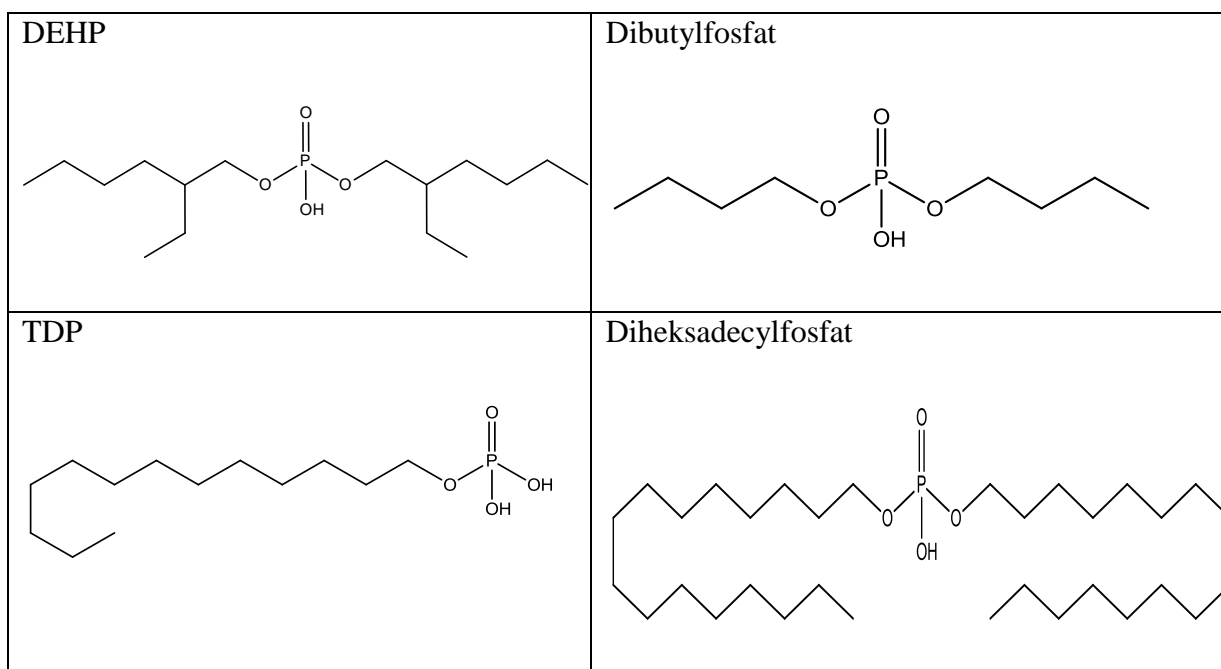
diffusjon samt fordeling inn i den organiske fasen være høy; dermed øker mulighetene for ekstraksjon over i akseptorfasen selv uten transportmolekyler tilstede.

Tabell 6.3-1: Ulike transportmolekyler med tilhørende antall peptider detektert i akseptorfasen fra en donorfase med ni peptider. Til sammenligning er DEHP og 1-oktanol:IBK uten transportmolekyl, inkludert i tabellen.

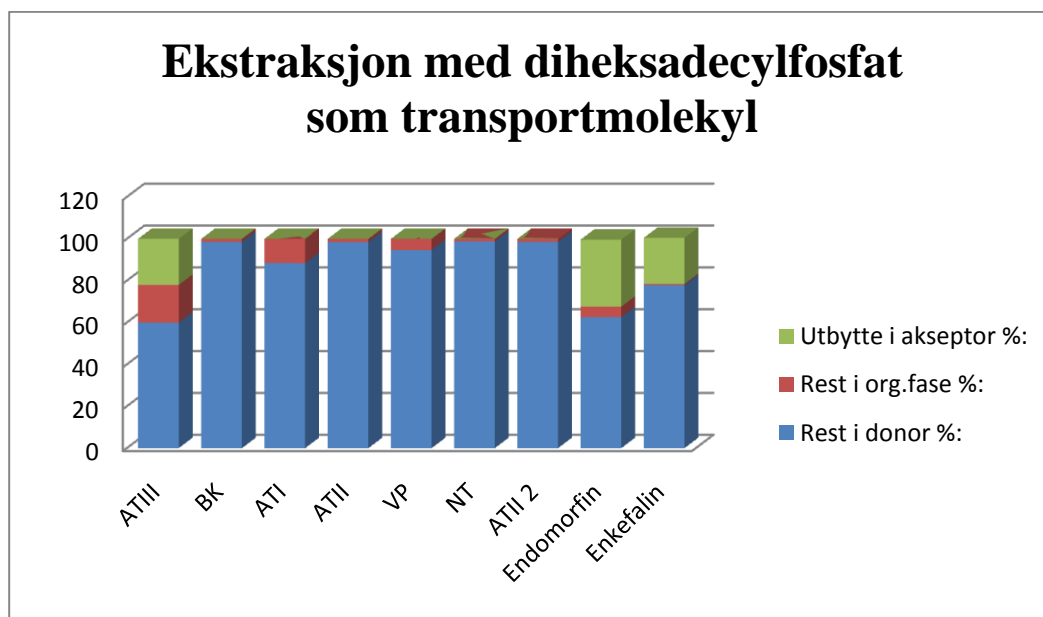
TRANSPORTMOLEKYL	Ant. peptider detektert i akseptorfasen	TRANSPORTMOLEKYL	Ant. peptider detektert i akseptorfasen
DEHP	9	Tri(8-quionyl)fosfat	3
Tridecylfosfat (TDP)	9	Tri-tert-butylborat	2
Tetraheksylamoniumbromid	0	Stearinsyre (Na-salt)	2
Tetrabutylammoniumbromid	0	Tris-2-etylheksylfosfat	2
Diheksadecylfosfat	3	Kaprylsyre	2
Tris(2-butoksyetyl)fosfat	2	Trietylfosfat	2
Bis(4-nitrofenyl)fosfat	3	Trixylylfosfat	2
Triisopropylfosfat	2	Fenylborsyre	2
Dibutylfosfat	7	1-Naftalenkarboksylsyre	2
2-Nitrofenyloktyleter	2	Trifenylfosfat	2
Tributylfosfat	3	Oktanol:IBK (60:40)	2

Elektrisk potensial: 10 V, Ekstraksjonstid: 5 minutter, Agitasjon 900 rpm, Væskemembran: 1-oktanol:IBK:transportmolekyl (55:35:10).

Av de 20 ulike transportmolekylene var bare to på nivå med DEHP: tridecylfosfat (TDP) og dibutylfosfat. Som vist i figur 6.3-1, har DEHP, TDP og dibutylfosfat en viss strukturlikhet. De er alle fosfater med alkylkjeder samt en hydroksylgruppe (bundet til fosfatomet) som kan gi negativ ladning; dermed kan de danne ionpar med peptidene. Det ser ut som om dette er viktige egenskaper for at et transportmolekyl skal fungere i EME av peptider. Diheksadecylfosfat er et annet eksempel på et transportmolekyl som besitter disse egenskapene. I forsøkene ga imidlertid ikke diheksadecylfosfat ekstraksjonsutbytter på samme nivå som TDP, DEHP og dibutylfosfat. Figur 6.3-2 viser peptidenes fordeling i de ulike fasene ved bruk av diheksadecylfosfat som transportmolekyl.



Figur 6.3-1: Kjemisk struktur for DEHP, TDP, dibutylfosfat og diheksadecylfosfat.
Kilde: [23]



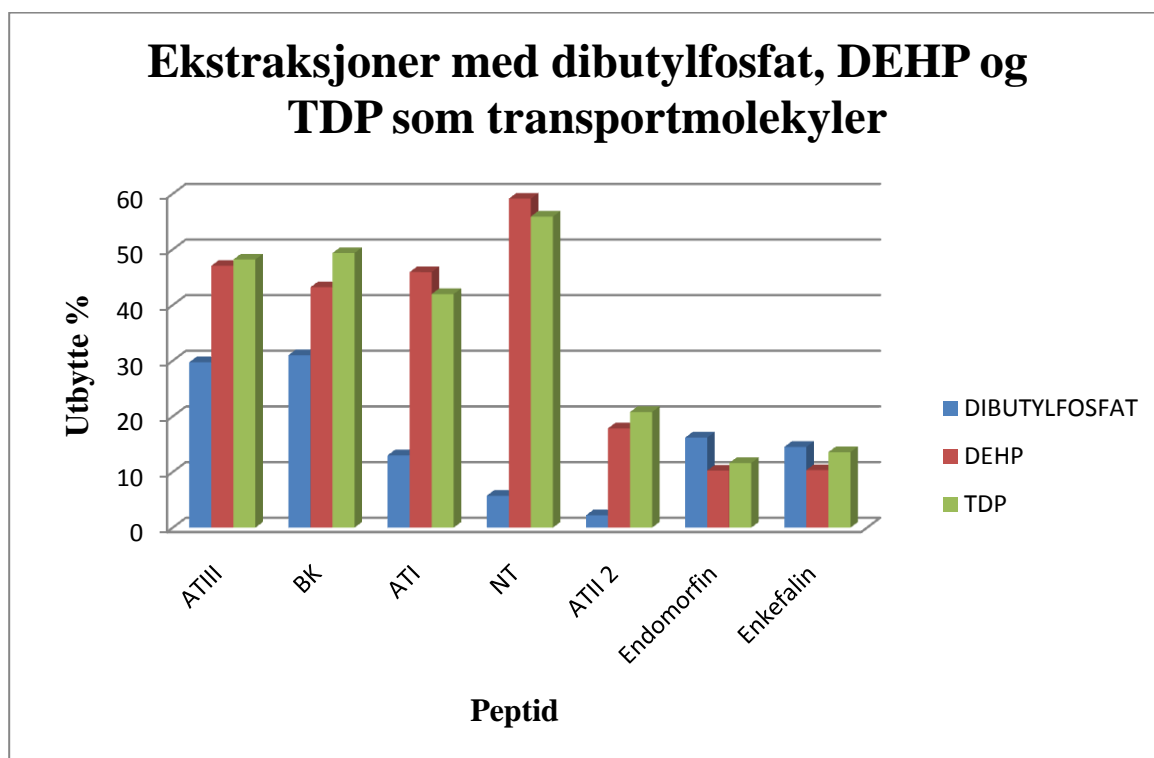
Figur 6.3-2: Ekstraksjon med diheksadecylfosfat som transportmolekyl. Fordeling av peptidene i de ulike fasene.
Elektrisk potensial: 10 V, Ekstraksjonstid: 5 minutter, Agitasjon 900 rpm, Væskemembran: 1-oktanol:IBK:diheksadecylfosfat.

Etter fem minutters ekstraksjon ble den største andelen av peptidene gjenfunnet i donorfasen. Dette tyder på at transportmolekylets binding til peptidene er lav. Ettersom pKa-verdien til diheksadecylfosfat er 1.5 [23], vil den være negativt ladet i overgangen til donorfasen som har pH 3.0, og følgelig kan den danne ionpar med de positivt ladede peptidene. Årsaken til at

diheksadecylfosfat allikevel ikke egner seg som transportmolekyl kan være at de lange alkylkjedene (se fig. 6.3-1) gir en sterisk hindring for binding til peptidene.

6.3.2 Sammenligning av transportmolekyler

Screeningforsøket hadde vist at DEHP, TDP og dibutylfosfat var de transportmolekylene som ga de beste utbyttene. For å sammenligne utbyttene ble det utført nye ekstraksjoner med disse tre ulike stoffene. Donorfasen ble tillaget ved å fortynne standardløsning til 20 µg/ml med 1 mM HCl pH 3.0. 1-oktanol:IBK:transportmolekyl (55:35:10) utgjorde den organiske fasen og 50 mM HCl pH 1.3, utgjorde akseptorfasen. Ekstraksjonen fikk pågå i fem minutter med en påført spenning på 10 volt og en agitasjonshastighet på 900 rpm. Ekstraksjonene ble utført i tre paralleller.



Figur 6.3-3: Utbytte med dibutylfosfat, DEHP respektive TDP som transportmolekyl. Grunnet utilstrekkelig grunnlinjeseparasjon ble ATII og VP utelatt. Elektrisk potensial: 10 V, Ekstraksjonstid: 5 minutter, Agitasjon: 900 rpm, Væskemembran: 1-oktanol:IBK:transportmolekyl

Figur 6.3-3 viser en sammenligning av ekstraksjonsutbyttene ved bruk av dibutylfosfat, DEHP respektive TDP som transportmolekyl. Av de tre transportmolekylene DEHP, TDP og dibutylfosfat ga sistnevnte de laveste utbyttene for samtlige peptider bortsett fra for endomorfine og enkefalin som for øvrig ekstraheres over uavhengig av transportmolekyler. DEHP og TDP ga relativt like utbytter.

Tabell 6.3-2: Relative standardavvik for ekstraksjonene med de ulike transportmolekylene DEHP, TDP og dibutylfosfat

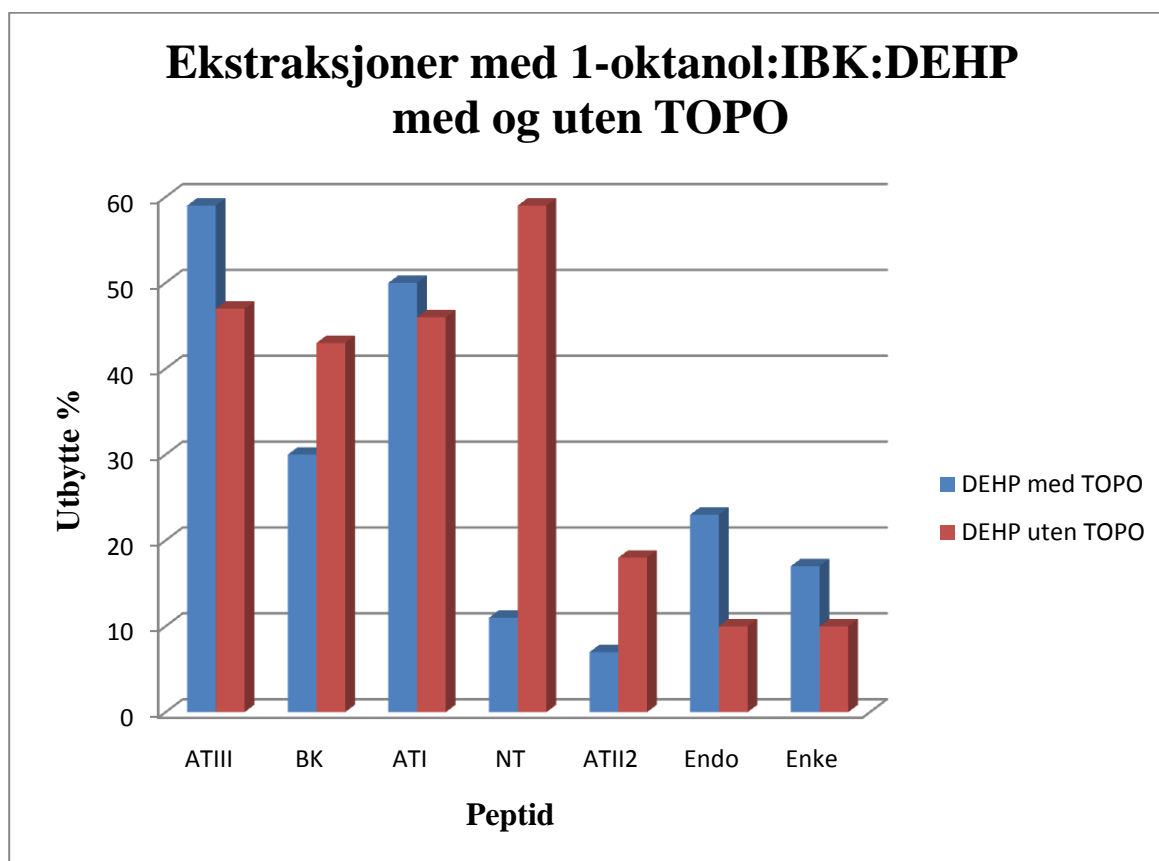
Repeterbarhet (% RSD), n=3, konsentrasjon i prøveløsning 20 µg/ml

	ATIII	BK	ATI	NT	ATII2	Endo	Enke
DEHP	3	6	3	13	11	8	7
TDP	14	14	15	14	16	14	13
DIBUTYLFOSFAT	11	20	12	15	8	14	10

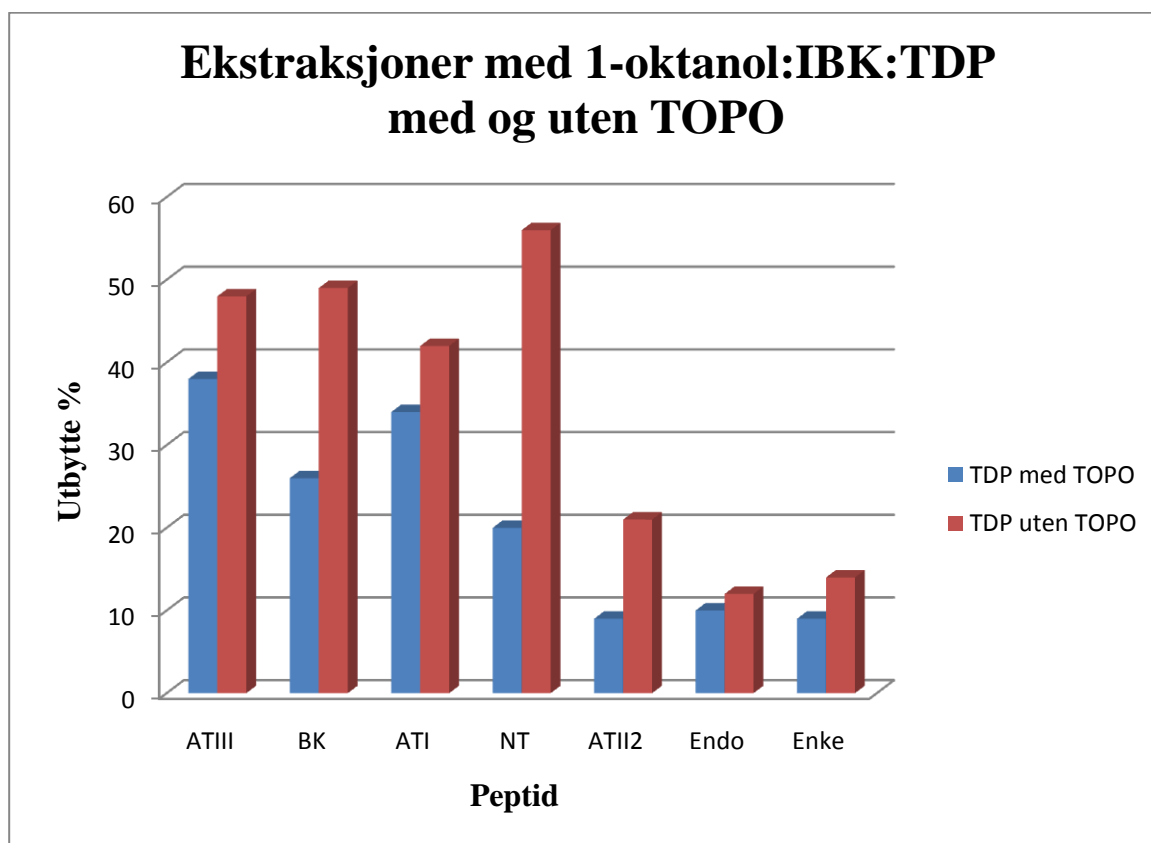
Tabell 6.3-2 viser repeterbarheten basert på tre paralleller fra en prøveløsning med konsentrasjon 20 µg/ml. Repeterbarheten angir spredningen i analyseresultatene og benevnes med % RSD (relativt standardavvik). Med tanke på at alt utstyret som er brukt i dette arbeidet er hjemmelaget og at ingen ledd i ekstraksjonen er automatisert, må det påberegnes at de relative standardavvikene blir høyere enn for validerte metoder. Repeterbarheten vist i tabell 6.3-2 ligger imidlertid på et akseptabelt nivå sammenlignet med retningslinjer for metodevalidering [28].

6.3.3 Tiltak for å øke ekstraksjonsutbyttene

Da verken TDP eller DEHP ga spesielt høye utbytter ble det iverksatt tiltak for å øke ekstraksjonsutbyttene. I et forsøk på å forbedre utbyttene ble tri-*n*-oktylfosfinoksid (TOPO) tilsatt i de organiske fasene med TDP respektive DEHP. Til forskjell fra TDP og DEHP som danner ioniske interaksjoner, vil TOPO danne hydrogenbindingsinteraksjoner med peptidene. Ved å tilsette både TOPO og DEHP/TDP i den organiske fasen, vil peptidene ha flere muligheter for å fraktes over den kunstige væskemembranen og en påfølgende økning i utbytte vil teoretisk sett kunne inntreffe. For å undersøke dette i praksis ble det utført tre parallelle ekstraksjoner der 1-oktanol:IBK:DEHP (55:35:10) + 5 mM TOPO utgjorde den organiske fasen. Deretter ble det utført tre parallelle ekstraksjoner der den organiske fasen bestod av 1-oktanol:IBK:TDP (55:35:10) + 5 mM TOPO. I samtlige ekstraksjoner ble standardløsning fortynnet til donorløsning, 20 µg/ml, med 1 mM HCl pH 3.0. Akseptorfasen var 50 mM HCl pH 1.3, ekstraksjonstid fem minutter, spenning 10 volt og agitasjon 900 rpm.



Figur 6.3-4: Ekstraksjoner med 1-oktanol:IBK:DEHP med og uten TOPO. Grunnet utilstrekkelig grunnlinjeseparasjon ble ATII og VP utelatt.
Elektrisk potensial: 10 V, Ekstraksjonstid: 5 minutter, Agitasjon: 900 rpm, Kunstig væskemembran: 1-oktanol:IBK:DEHP (55:35:10) med og uten 5 mM TOPO.

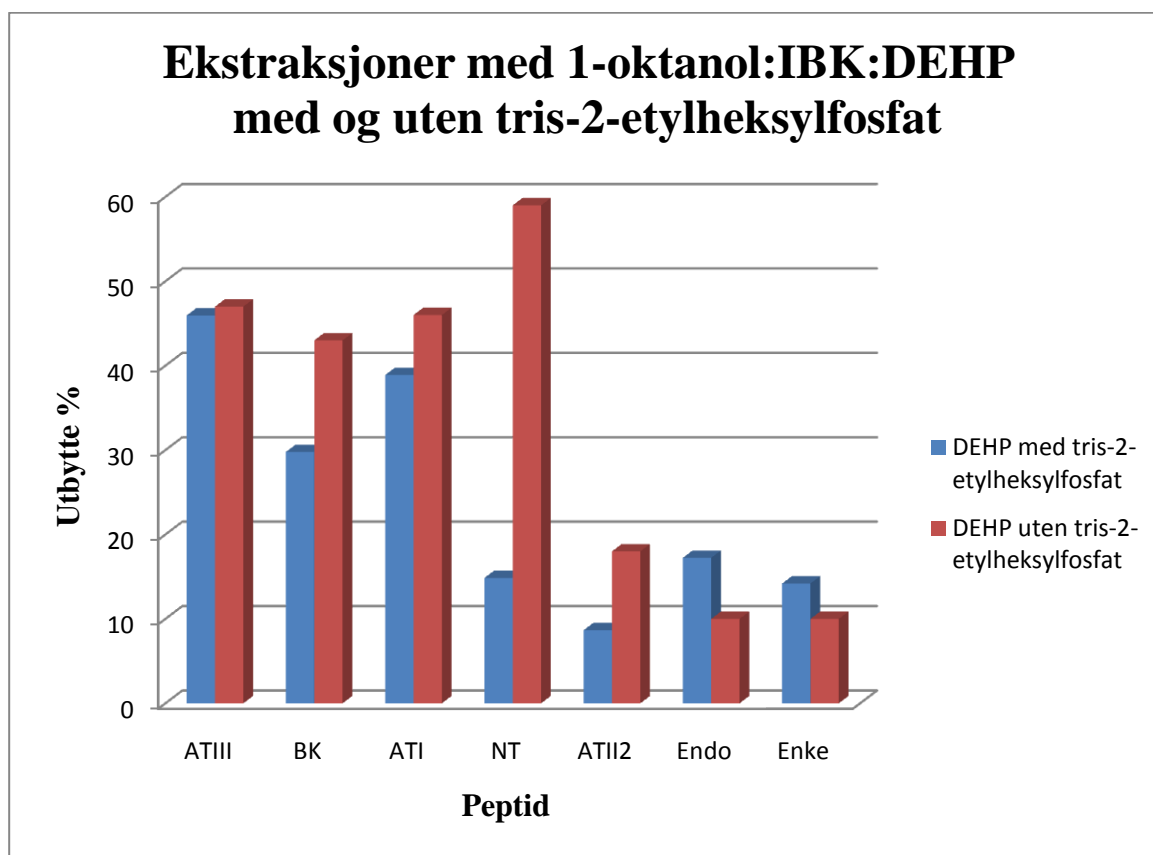


Figur 6.3-5: Ekstraksjoner med 1-oktanol:IBK:TDP med og uten TOPO. Grunnet utilstrekkelig grunnlinjeseparasjon ble ATII og VP utelatt.

Elektrisk potensial: 10 V, Ekstraksjonstid: 5 minutter, Agitasjon: 900 rpm, Kunstig væskemembran: 1-oktanol:IBK:TDP med og uten 5 mM TOPO

Figur 6.3-4 og 6.3-5 viser at tilsats av TOPO ikke ga noen total utbyttegevinst. Kombinasjonen TDP og TOPO ga lavere utbytter enn TDP alene. Kombinasjonen DEHP og TOPO viste et litt annet mønster men heller ikke i dette forsøket ga TOPO noen generell økning i utbytte.

I neste forsøk ble TOPO byttet ut med tris-2-etylheksylfosfat som også kan danne hydrogenbindingsinteraksjoner med peptidene. Donorfasen og akseptorfasen ble tillaget på samme måte som ved forsøkene med TOPO. Det ble utført tre parallelle ekstraksjoner med en organisk fase bestående av 1-oktanol:IBK:DEHP + 5 mM tris-2-etylheksylfosfat. Øvrige ekstraksjonsbetingelser var de samme som tidligere.



Figur 6.3-6: Ekstraksjoner med 1-oktanol:IBK:DEHP med og uten tris-2-etylheksylfosfat. Grunnet utilstrekkelig grunnlinjeseparasjon ble ATII og VP utelatt. *Elektrisk potensial: 10 V, Ekstraksjonstid: 5 minutter, Agitasjon: 900 rpm, Kunstig væskemembran: 1-oktanol:IBK:DEHP med og uten 5 mM tris-2-etylheksylfosfat.*

Figur 6.3-6 viser resultatene fra ekstraksjonene med og uten tris-2-etylheksylfosfat. Tilsatt av tris-2-etylheksylfosfat til 1-oktanol:IBK:DEHP ga ikke økte ekstraksjonsutbytter.

En oppsummering av forsøkene med TOPO og tris-2-etylheksylfosfat viser at NT skiller seg ut. I forsøket med DEHP + TOPO, TDP + TOPO så vel som i forsøket med DEHP + tris-2-etylheksylfosfat synker utbyttet til under halvparten da hydrogenbinderen tilsettes. NT er det største peptidet, med flest hydrogenbindings seter (se vedlegg II) og kan således danne de sterkeste interaksjonene med TOPO og tris-2-etylheksylfosfat. Teoretisk sett burde NT i kombinasjon med ett av disse stoffene, lettere ta seg gjennom den hydrofobe organiske fasen. Ettersom dette ikke inntreffer er det mulig at peptid-hydrogenbinderkomplekset fanges i den organiske fasen. Innholdet av NT i den organiske fasen etter ekstraksjon var imidlertid 12, 20 og 22 prosent for henholdsvis DEHP+TOPO, TDP+TOPO og DEHP+tris-2-etylheksylfosfat. Den største andelen NT ble gjenfunnet i donorfasen. Dette tyder på at fordelingen av NT inn i den organiske fasen blir lavere i nærvær av hydrogenbinder.

6.4 Karboksylsyrer som transportmolekyler

Det ble testet tre karboksylsyrer i screeningforsøket, imidlertid ga ingen av disse positive resultater. En årsak til dette kan være at karboksylsyrenes negative ladning ikke var tent grunnet for lav pH (pH 3.0) i overgangen mellom donor og organisk fase. Dermed var det ikke mulig for karboksylsyrene å danne ionpar med peptidene. For å undersøke hvor mye surhetsgraden i donorløsningen har å si for karboksylsyrs funksjon som transportmolekyl, ble det utført ekstraksjoner der donorløsningens pH-verdi var justert til to pH-enheter over syrens pKa-verdi. På denne måten sikres deprotonering av syren i overgangen mellom donorfase og organisk fase. Til dette forsøket ble de ulike donorløsningene tillaget ved å fortynne standardløsning til en peptidkonsentrasjon på 10 µg/ml med henholdsvis ammoniumformatbuffer pH 4.1, ammoniumformatbuffer pH 5.0, fosfatbuffer pH 6.1 og fosfatbuffer pH 7.4. (Endringer i pH i donorfasen vil også påvirke peptidenes ladning. Figur 6.2-1 viser imidlertid at ekstraksjon vil finne sted selv ved pH 7.4.) Deretter ble det tillaget fem ulike organiske faser bestående av 1-oktanol:IBK (60:40) mettet med ønsket karboksylsyre. 50 mM HCl pH 1.3 utgjorde akseptorfasen. Tabell 6.4 viser hvilke donorfaser som korresponderer med hvilke karboksylsyrer.

Tabell 6.4: Karboksylsyrer med pKa-verdier samt pH-verdi i respektive donorløsning.

Karboksylsyre	pKa ¹	pH i donor
1.9-Nonandikarboksylsyre	2.2	4.1
2.6-Naftalendikarboksylsyre	3.7	6.1
Difenyleddiksyre	4.7	7.4
Para-aminobensosyre	4.8	7.4
1.2-Bensendikarboksylsyre	3.0	5.0

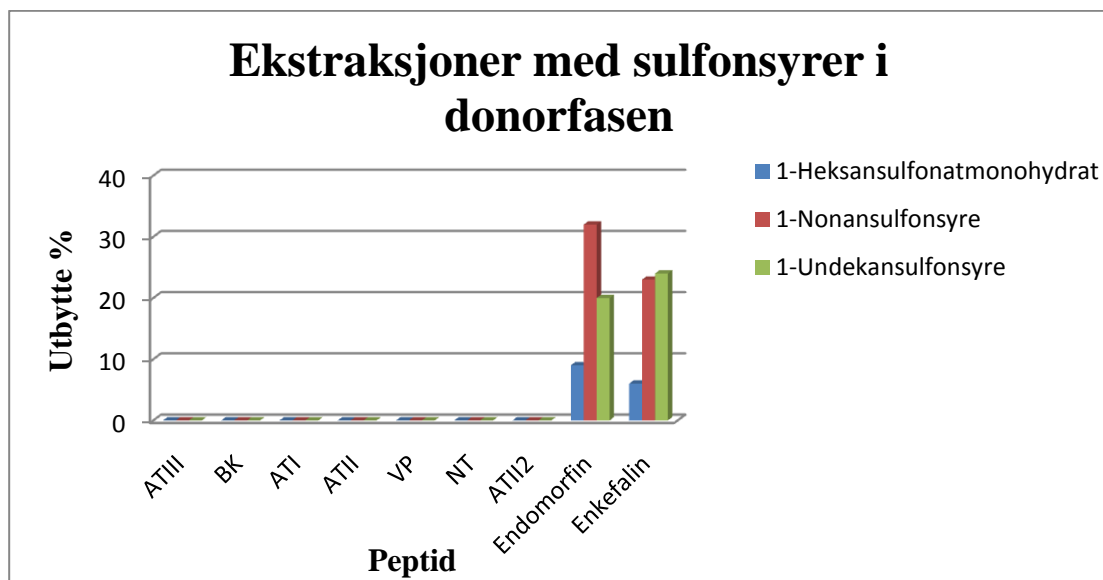
1) Kilde: [23]

Etter fem minutters ekstraksjon med en spenning på 10 volt og en agitasjon på 900 rpm ble akseptorfasene analysert i CE-apparatet. Resultatene fra samtlige av de fem karboksylsyrene 1.9-nonandikarboksylsyre, 2.6-naftalendikarboksylsyre, difenyleddiksyre, para-aminobensosyre og 1.2-bensendikarboksylsyre viste imidlertid samme trend som tidligere: de eneste to peptidene som ble detektert i akseptorfasen var endomorfin og enkefalin.

Ettersom karboksylsyrenes løselighet i 1-oktanol:IBK er lav, kan årsaken til at ekstraksjonsutbyttene uteble være utilstrekkelig konsentrasjon av karboksylsyren i den organiske fasen.

6.5 Effekt av transportmolekyler i prøveløsningen

Det er tidligere gjort studier som viser at sulfonsyrer kan danne ionpar med peptider og på denne måten øke peptidenes løselighet i organiske løsemidler [29, 30]. På bakgrunn av dette ble det undersøkt om tilsats av sulfonsyre direkte i prøveløsningen kunne øke ekstraksjonsutbyttene. Det ble valgt å bruke de tre sulfonsyrene 1-heksansulfonatmonohydrat (Na-salt), 1-nonansulfonsyre (Na-salt) og 1-undekansulfonsyre (Na-salt). Donorløsninger ble tillaget ved å fortynne standardløsning med 1 mM HCl pH 3.0, til en peptidkonsentrasjon på 20 µg/ml. Deretter ble donorløsningene tilsatt henholdsvis 1-heksansulfonatmonohydrat, 1-nonansulfonsyre og 1-undekansulfonsyre i konsentrasjonen 50 mM. 1-oktanol:IBK (60:40) utgjorde den organiske fasen, mens 50 mM HCl pH 1.3, utgjorde akseptorfasen i samtlige forsøk. Det ble utført to paralleller av hver ekstraksjon som fikk pågå i fem minutter, under en pålagt spenning på 10 volt og en agitasjon på 900 rpm.



Figur 6.5: Utbytte med sulfonsyrer i donorfase.

Elektrisk potensial: 10 V, Ekstraksjonstid: 5 minutter, Agitasjon: 900 rpm, Kunstig væskemembran: 1-oktanol:IBK.

Av figur 6.5 fremgår det at enkefalin og endomorfin var de eneste peptidene som ble ekstrahert i EME med sulfonsyrer i donorfase. Som vist i underavsnitt 6.3.1, ekstraheres imidlertid disse to peptidene over den organiske fase 1-oktanol:IBK selv uten nærvær av transportmolekyler. En mulig forklaring på at dette forsøket ikke fungerte etter hensikten er at kompleksene blir for hydrofobe; de migrerer inn i den organiske fase men peptidene frigjøres ikke til akseptorfase. Det var ikke mulig å utføre noen god manuell integrering av toppene i elektroferogrammene for donorfase, da signalene var for lave. De lave signalene tyder imidlertid på at peptidkonsentrasjonen i donorfase var lav. Lav konsentrasjon i donor og udetekterbar konsentrasjon i akseptor, indikerer at en stor del av peptidene var fanget i den organiske fase.

7. Konklusjon

Forsøkene med DEHP og eugenol ved ulike pH-betingelser har vist at den teoretiske modellen for seleksjon av peptider, basert på deres pI-verdier, var for enfoldig. Selv om peptidenes positive ladninger til stor del slukkes, ser det ut som om diffusjonen og fordelingen i de ulike væskene påvirker ekstraksjonsutbyttet i større grad enn antatt. En mer avansert teoretisk modell som tar hensyn til samspillet av stoffegenskaper bør ligge til grunn neste gang mulighetene for selektiv EME skal undersøkes.

Transportmolekylene DEHP, TDP og dibutylfosfat ga lovende resultater og disse bør det arbeides videre med, forslagsvis i kombinasjon med andre organiske løsemidler. Resultatene tyder på at fosfater, mono- eller disubstituert med en alkylkjede, egner seg som transportmolekyler i EME. Resultatene fra forsøkene med TOPO og tris-2-etylheksylfosfat viste at det har liten hensikt å blande noen av disse stoffene i den organiske fasen for å øke utbyttene. Imidlertid bør det utføres nye forsøk med TOPO og tris-2-etylheksylfosfat uten tilsats av DEHP eller TDP, for å se hvilke utbytter dette ville gi.

Arbeidet har vist at karboksylsyrer ikke egner seg som transportmolekyler i kombinasjon med 1-oktanol:IBK. Ettersom karboksylsyrenes løselighet i 1-oktanol:IBK var lav, bør andre organiske løsemidler benyttes hvis flere forsøk med karboksylsyrer skal utføres. Heller ikke sulfonsyrer tilsatt direkte i donorfasen egner seg som transportmolekyler i kombinasjon med den aktuelle organiske fasen. Resultatene fra disse forsøkene indikerer at peptid-sulfonsyrekomplekset blir for hydrofobt, og dermed fanges komplekset i den organiske fasen.

En gjennomgående trend i forsøkene var at de små, hydrofobe peptidene endomorfine og enkefalin ble ekstrahert over den organiske fasen 1-oktanol:IBK med eller uten transportmolekyler. Forhåpentligvis kan dette fange interessen for videreutvikling av 1-oktanol:IBK som organisk fase ved EME av små og hydrofobe peptider

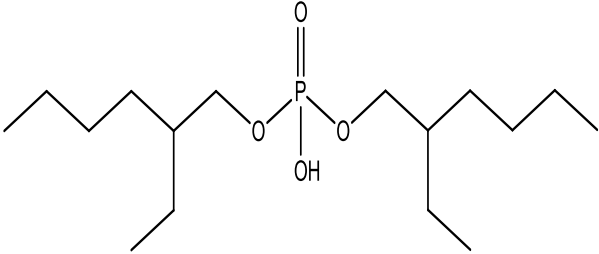
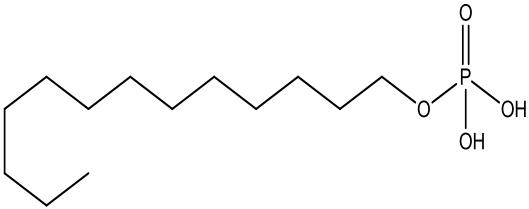
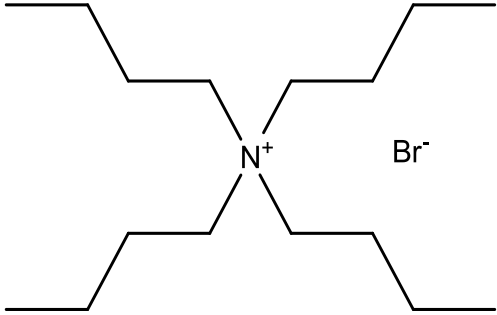
8. Referansliste

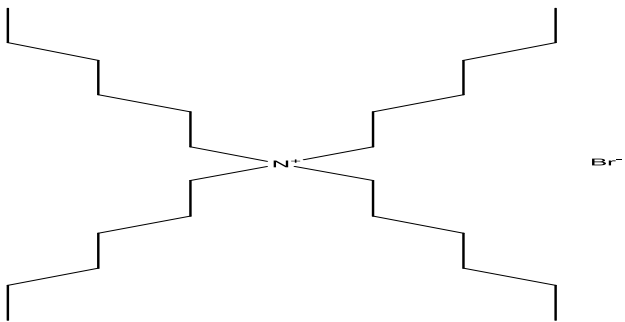
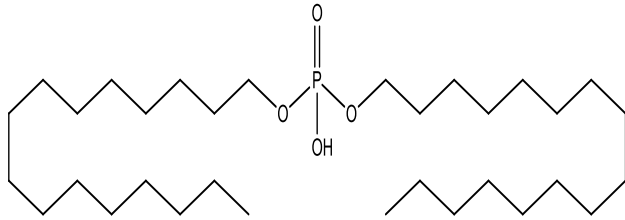
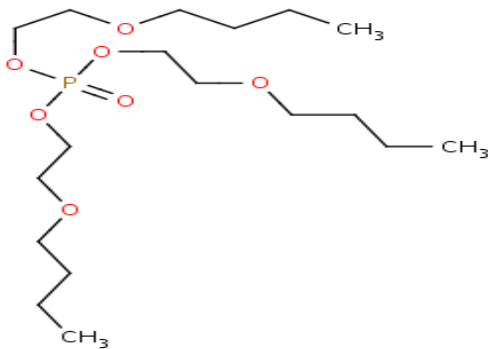
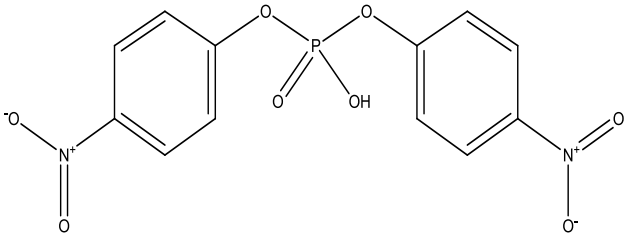
1. Jakubowska, N., Polkowska, Z., Namiesnik, J., and Przyjazny, A., *Analytical applications of membrane extraction for biomedical and environmental liquid sample preparation*. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2005. **35**(3): p. 217-235.
2. Zhao, L.M. and Lee, H.K., *Application of static liquid-phase microextraction to the analysis of organochlorine pesticides in water*. Journal of Chromatography A, 2001. **919**(2): p. 381-388.
3. Frazey, P.A., Barkley, R.M., and Sievers, R.E., *Solid-phase microextraction with temperature programmed thermal desorption for analysis of halocarbon compounds*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 1997. **213**: p. 113-ANYL.
4. Theodoridis, G., Koster, E.H.M., and de Jong, G.J., *Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples*. Journal of Chromatography B, 2000. **745**(1): p. 49-82.
5. Jeannot, M.A. and Cantwell, F.F., *Solvent microextraction into a single drop*. Analytical Chemistry, 1996. **68**(13): p. 2236-2240.
6. Liu, H.H. and Dasgupta, P.K., *Analytical chemistry in a drop*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 1996. **15**(9): p. 468-475.
7. Pawliszyn, J. and Pedersen-Bjergaard, S., *Analytical microextraction: Current status and future trends*. Journal of Chromatographic Science, 2006. **44**(6): p. 291-307.
8. Pedersen-Bjergaard, S. and Rasmussen, K.E., *Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(14): p. 2650-2656.
9. Gjelstad, A., Rasmussen, K.E., and Pedersen-Bjergaard, S., *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes - Tuning the membrane chemistry to different types of drug substances*. Journal of Chromatography A, 2006. **1124**(1-2): p. 29-34.
10. Pedersen-Bjergaard, S. and Rasmussen, K.E., *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes - New concept for rapid sample preparation of biological fluids*. Journal of Chromatography A, 2006. **1109**(2): p. 183-190.
11. Balchen, M., Gjelstad, A., Rasmussen, K.E., and Pedersen-Bjergaard, S., *Electrokinetic migration of acidic drugs across a supported liquid membrane*. Journal of Chromatography A, 2007. **1152**(1-2): p. 220-225.
12. Balchen, M., Halvorsen, T.G., Reubsaet, L., and Pedersen-Bjergaard, S., *Rapid isolation of angiotensin peptides from plasma by electromembrane extraction*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(41): p. 6900-5.
13. Balchen, M., Hatterud, A.G., Reubsaet, L., and Pedersen-Bjergaard, S., *Fundamental studies on the electrokinetic transfer of net cationic peptides across supported liquid membranes*. Journal of Separation Science, 2010.
14. Balchen, M., Jensen, H., Reubsaet, L., and Pedersen-Bjergaard, S., *Potential-driven peptide extractions across supported liquid membranes: investigation of principal operational parameters*. Journal of Separation Science, 2010. **33**(11): p. 1665-72.
15. Balchen, M., Reubsaet, L., and Pedersen-Bjergaard, S., *Electromembrane extraction of peptides*. Journal of Chromatography A, 2008. **1194**(2): p. 143-149.
16. Gjelstad, A., Rasmussen, K.E., and Pedersen-Bjergaard, S., *Simulation of flux during electro-membrane extraction based on the Nernst-Planck equation*. Journal of Chromatography A, 2007. **1174**(1-2): p. 104-111.
17. Gjelstad, A., Rasmussen, K.E., and Pedersen-Bjergaard, S., *Electromembrane extraction of basic drugs from untreated human plasma and whole blood under physiological pH conditions*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009. **393**(3): p. 921-928.
18. Middelthon-Bruer, T.M., Gjelstad, A., Rasmussen, K.E., and Pedersen-Bjergaard, S., *Parameters affecting electro membrane extraction of basic drugs*. Journal of Separation Science, 2008. **31**(4): p. 753-759.
19. Pedersen-Bjergaard, S., Kjelsen, I.J.O., Gjelstad, A., and Rasmussen, K.E., *Low-voltage electromembrane extraction of basic drugs from biological samples*. Journal of Chromatography A, 2008. **1180**(1-2): p. 1-9.
20. Gjelstad, A., Andersen, T.M., Rasmussen, K.E., and Pedersen-Bjergaard, S., *Microextraction across supported liquid membranes forced by pH gradients and electrical fields*. Journal of Chromatography A, 2007. **1157**(1-2): p. 38-45.
21. Nojavan, S. and Fakhari, A.R., *Electro membrane extraction combined with capillary electrophoresis for the determination of amlodipine enantiomers in biological samples*. Journal of Separation Science, 2010. **33**(20): p. 3231-3238.

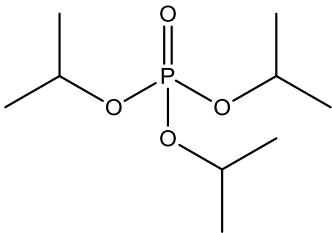
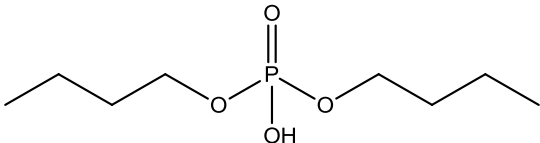
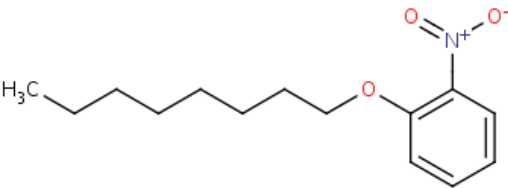
22. Xu, L., Hauser, P.C., and Lee, H.K., *Electro membrane isolation of nerve agent degradation products across a supported liquid membrane followed by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection*. Journal of Chromatography A, 2008. **1214**(1-2): p. 17-22.
23. *Explore Substances*. Available from: <https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>.
24. Rasmussen, S.P.-B.o.K.E., *Legemiddelanalyse*. 2004, Bergen, Norway: Fagbokforlaget. 503.
25. Heiger, D., *High performance capillary electrophoresis* 2000, Germany: Agilent Technologies 135.
26. *Peptide Property Calculator*. Available from: <http://www.innovagen.se/custom-peptide-synthesis/peptide-property-calculator/peptide-property-calculator.asp>.
27. David L. Nelson, M.M.C., *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3rd ed. 2000, New York, NY, USA: Worth Publishers. 1151.
28. *Guidance for industry: Bioanalytical method validation*. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>.
29. Adjei, A., Rao, S., Garren, J., Menon, G., and Vadnere, M., *Effect of Ion-Pairing on 1-Octanol-Water Partitioning of Peptide Drugs .1. The Nonapeptide Leuprolide Acetate*. International Journal of Pharmaceutics, 1993. **90**(2): p. 141-149.
30. Gjelstad, A., *Selektiv væskefasemikroekstraksjon av angiotensin I, II og III i humant plasma*. 2004: Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.
31. *Instant JChem*. Available from: <http://www.chemicalize.org/>.

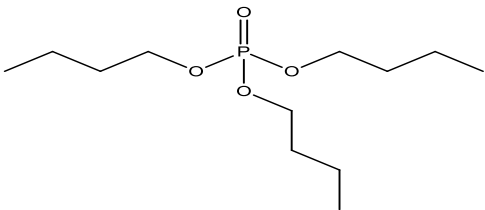
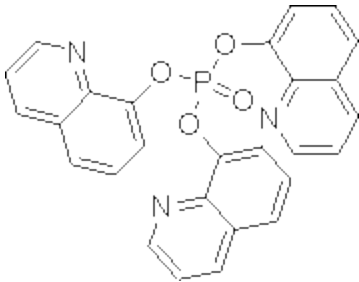
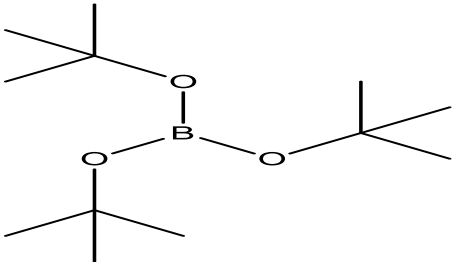
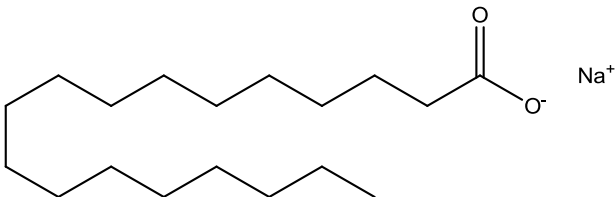
9. Vedlegg

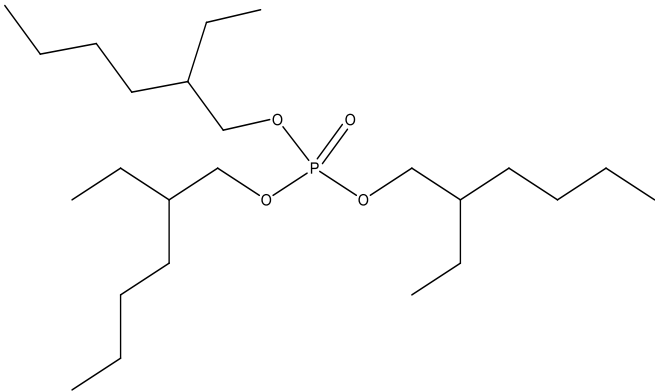
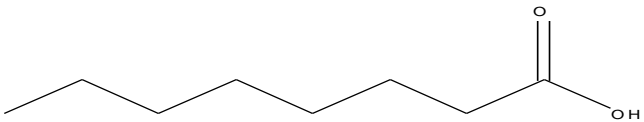
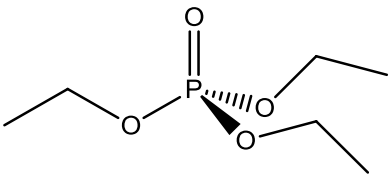
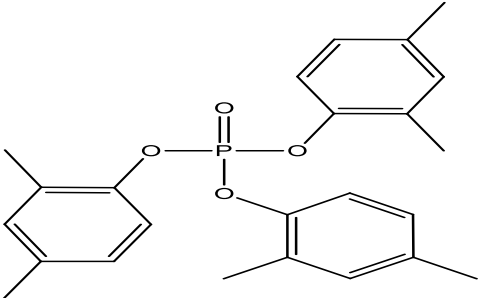
9.1 Vedlegg I - Transportmolekyler

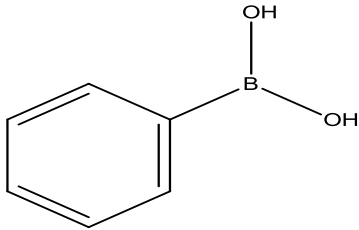
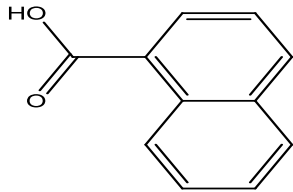
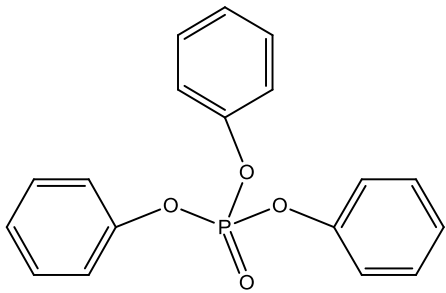
<i>Di(2-etylheksyl)fosfat - DEHP</i> 	<i>Kvalitet:</i> Ukjent <i>Produsent:</i> Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Sveits) <i>pKa:</i> 1.5 (sci finder)
<i>Tridecylfosfat – TDP</i> 	<i>Kvalitet:</i> Teknisk <i>Produsent:</i> Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland) <i>pKa:</i> 2.0 (sci finder)
<i>Tetrabutylammoniumbromid</i> 	<i>Kvalitet:</i> Ukjent <i>Produsent:</i> Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)

<p>Tetrahexylammoniumbromid</p> 	<p>Kvalitet: 99 %</p> <p>Produsent: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)</p>
<p>Diheksadecylfosfat</p> 	<p>Kvalitet: Ukjent</p> <p>Produsent: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)</p> <p>pKa: 1.5 (Sci finder)</p>
<p>Tris(2-butoksyetyl)fosfat</p> 	<p>Kvalitet: 94 %</p> <p>Produsent: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)</p>
<p>Bis(4-nitrofenyl)fosfat</p> 	<p>Kvalitet: 99 %</p> <p>Produsent: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)</p>

<p>Triisopropylfosfat</p> 	<p>Kvalitet: 95 %</p> <p>Produsent: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)</p>
<p>Dibutylfosfat</p> 	<p>Kvalitet: Teknisk</p> <p>Produsent: Fluka (Buchs, Sveits)</p> <p>pKa: 1.5 sci finder</p>
<p>2-Nitrofenyloktyleter</p> 	<p>Kvalitet: GC</p> <p>Produsent: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)</p>

<p><i>Tributylfosfat</i></p> 	<p><i>Kvalitet:</i> Ukjent</p> <p><i>Produsent:</i> Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)</p>
<p><i>Tri(8-quinolyl)fosfat</i></p> 	<p><i>Kvalitet:</i> $\geq 98,0 \%$</p> <p><i>Produsent:</i> Fluka (Buchs, Sveits)</p>
<p><i>Tri-tert-butylborat</i></p> 	<p><i>Kvalitet:</i> 98 %</p> <p><i>Produsent:</i> Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)</p>
<p><i>Stearinsyre (Na-salt)</i></p> 	<p><i>Kvalitet:</i> >99 %</p> <p><i>Produsent:</i> Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)</p>

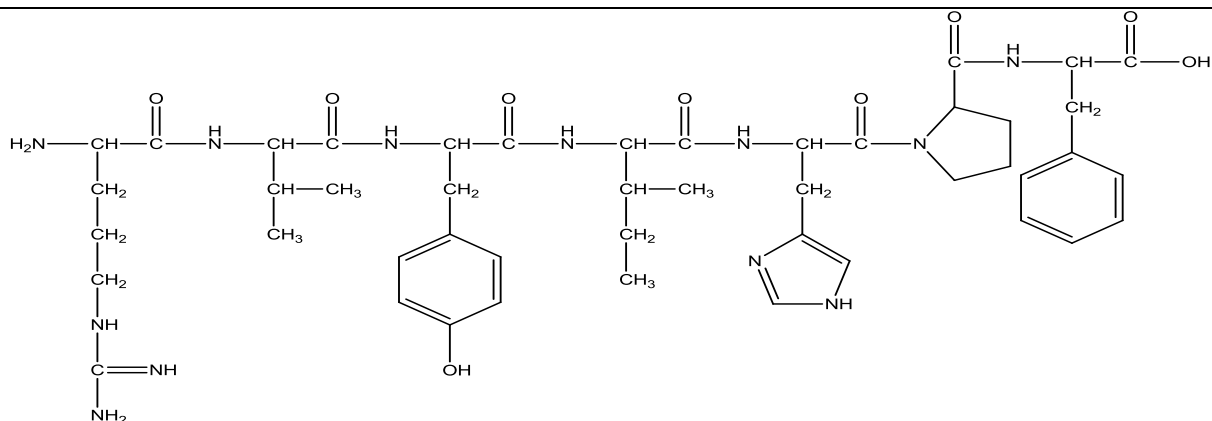
Tris-2-etylheksylfosfat  <chem>CCCCC(CC)COP(=O)(OCCCC(CC)C)OCCCC(CC)C</chem>	Kvalitet: >98 %
Kaprylsyre  <chem>CCCCCCCC(=O)O</chem>	Kvalitet: >98 % Produsent: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Trietylfosfat  <chem>CCOP(=O)(OCC)OCC</chem>	Kvalitet: >98 % Produsent: Fluka (Buchs, Sveits)
Trixylylfosfat  <chem>CC1=CC=C(C)C=C1OP(=O)(OC2=CC=C(C)C=C2)OC3=CC=C(C)C=C3</chem>	Kvalitet: >98 % Produsent: Fluka (Buchs, Sveits)

<p>Fenylborsyre</p> 	<p>Kvalitet: >97 %</p> <p>Produsent: Fluka (Buchs, Sveits)</p>
<p>1-Naftalenkarboksylsyre</p> 	<p>Kvalitet: 96 %</p> <p>Produsent: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)</p>
<p>Trifenylfosfat</p> 	<p>Kvalitet: 98 %</p> <p>Produsent: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)</p>

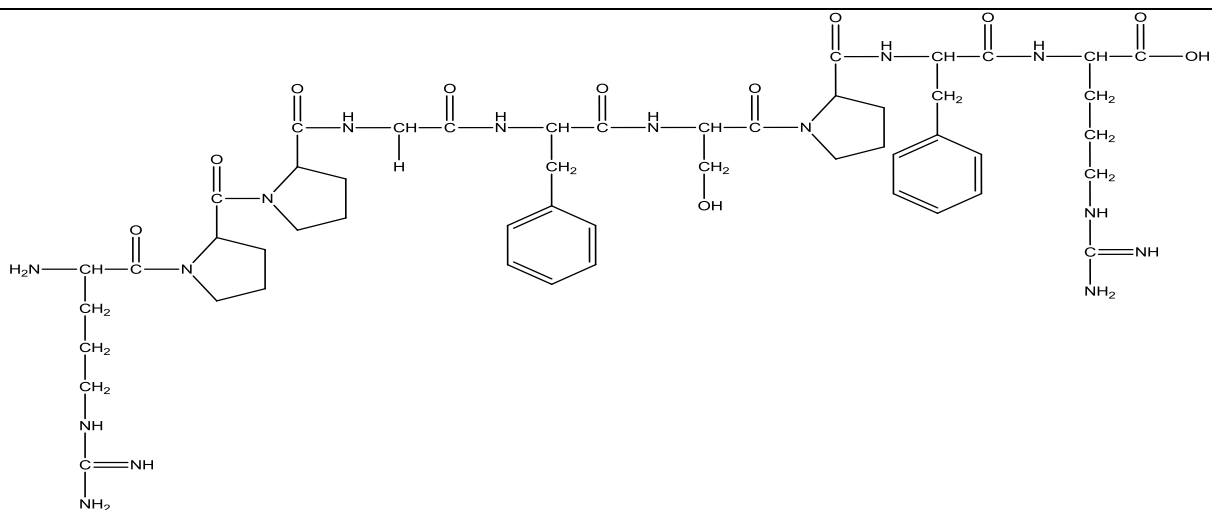
[31] Kilde figurer

[23] Kilde pKa-verdier

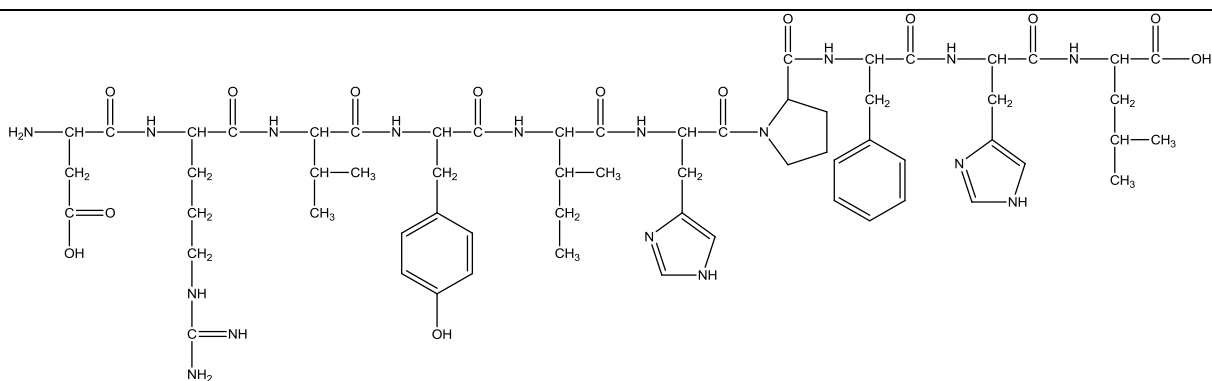
9.2 Vedlegg II - Peptidstrukturer



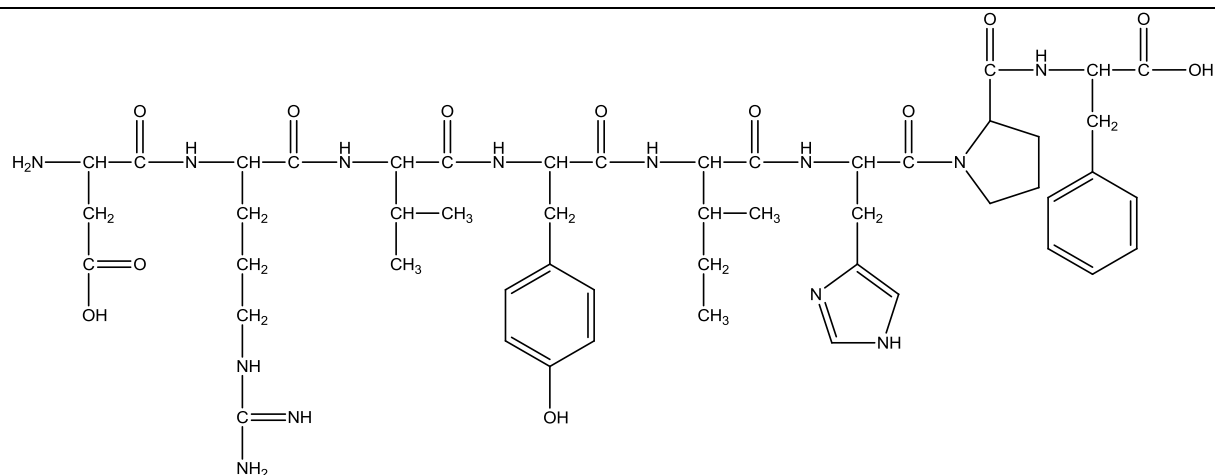
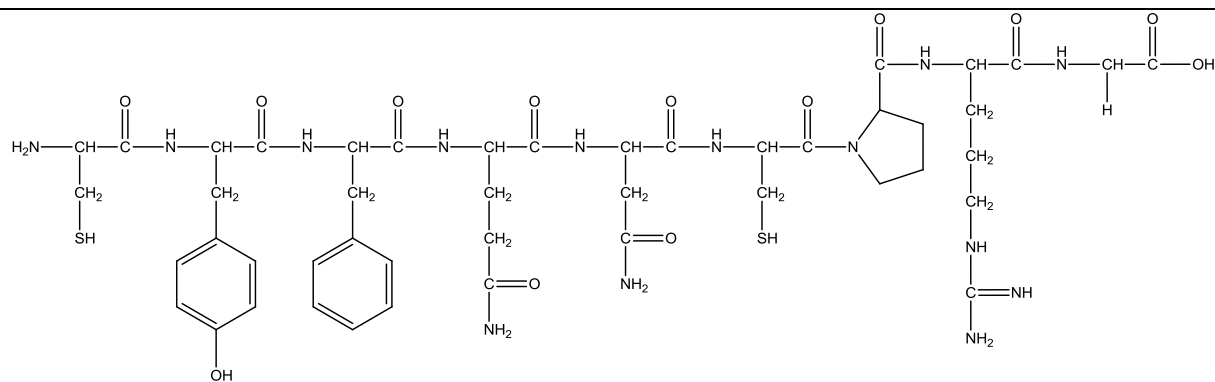
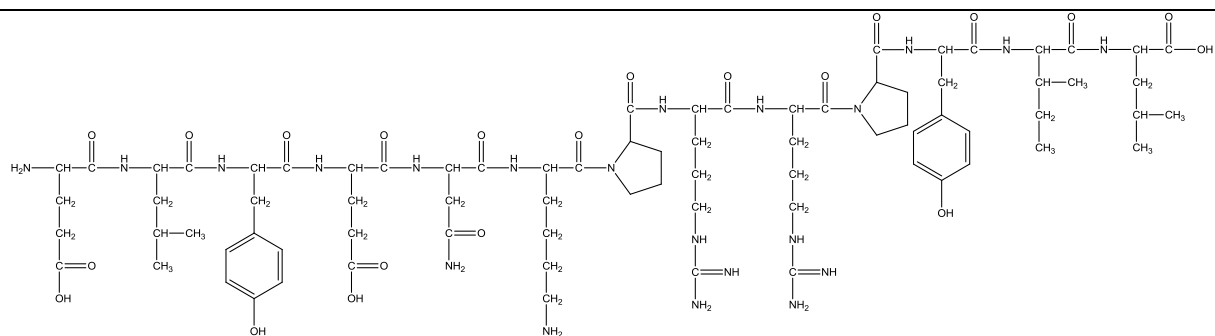
AT III

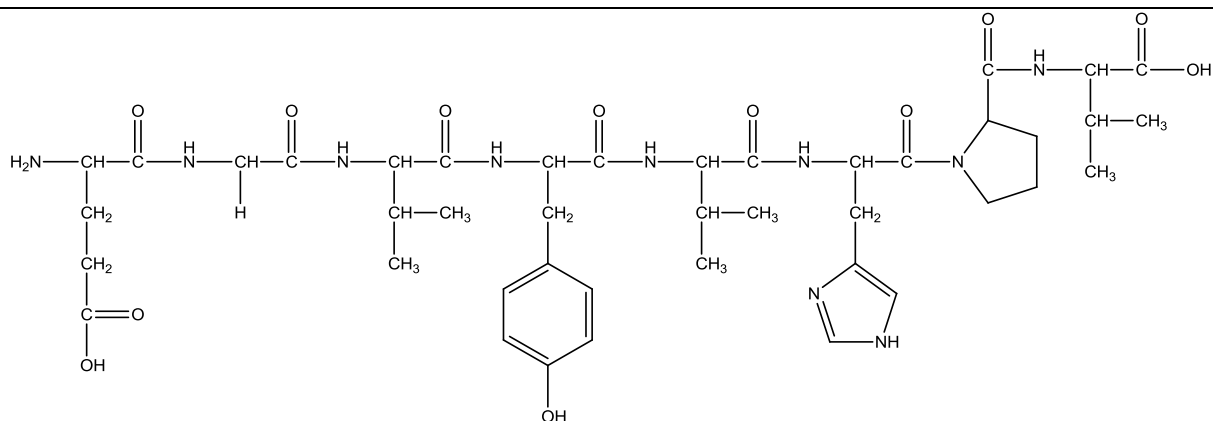
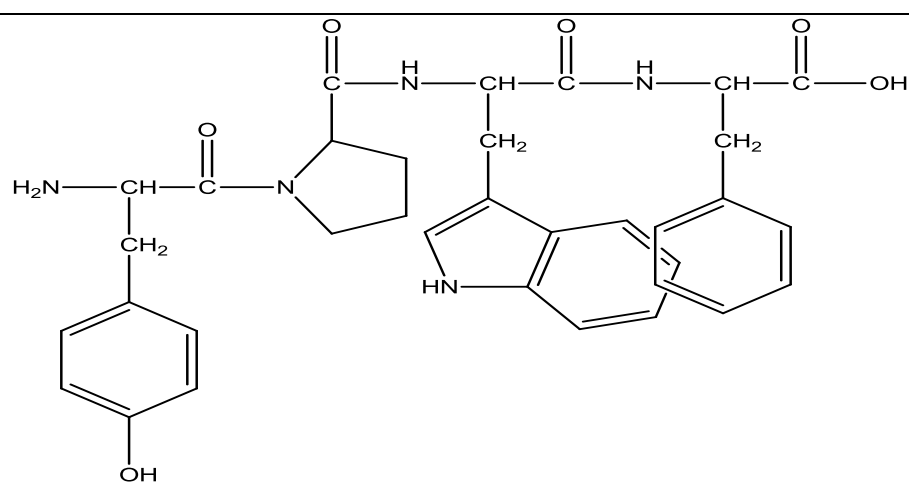
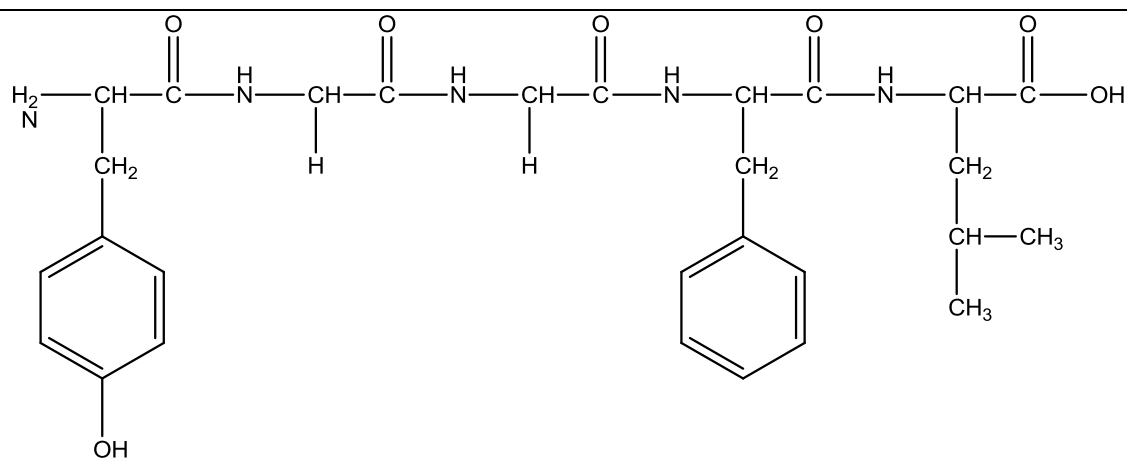


BK



ATI

**AT II****VP****NT**

**ATII2****Endomorphin****Enkefalin**